



**HAL**  
open science

# Analyse transcriptomique des cellules stromales mésenchymateuses au cours du traitement du Myélome Multiple

Léa Mitia, France, Mélanie, Emmanuelle Lemaitre

► **To cite this version:**

Léa Mitia, France, Mélanie, Emmanuelle Lemaitre. Analyse transcriptomique des cellules stromales mésenchymateuses au cours du traitement du Myélome Multiple. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02497330

**HAL Id: dumas-02497330**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02497330v1>**

Submitted on 3 Mar 2020

**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.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2019

N°112

**Mémoire du DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE  
« INNOVATION PHARMACEUTIQUES et RECHERCHE »**

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 octobre 1988, tient lieu de

**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par Léa, Mitia, France, Mélanie, Emmanuelle LEMAITRE

Née le 22 octobre 1989 à EVRY (91)

Le 29 Novembre 2019 à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

○○○

**Analyse transcriptomique des cellules stromales  
mésenchymateuses au cours du traitement du  
Myélome Multiple**

○○○

Directeur de thèse

**Madame le Professeur Bettina COUDERC**

Jury

**M. SEVENET Nicolas**, Pharmacien, PU-PH, CHU de Bordeaux

Président

**Mme COUDERC Bettina**, Professeur Université de Toulouse

Juge

**Mme CORRE Jill**, Pharmacien, MCU-PH, CHU de Toulouse

Juge

**Mlle WOLFF Elina**, Pharmacien Assistant, CHU de Toulouse

Juge

## RESUME

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie à cellules B, caractérisée par une expansion dans la moelle osseuse (BM) de plasmocytes malins (PC). Les patients atteints de MM et traités par différentes lignes de chimiothérapies rechutent fréquemment à cause de la présence de clones résiduels résistants au traitement. La compréhension des mécanismes responsables de ces rechutes semble nécessaire à ce jour pour l'amélioration des stratégies thérapeutiques. Les interactions entre les cellules de BM, dont les cellules stromales mésenchymateuses (MSC), et les PC, jouent un rôle essentiel dans la croissance et la survie du MM *via* la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Afin d'évaluer le rôle des MSC dans la rechute du patient nous avons effectué une analyse transcriptomique de MSC de BM provenant de donneurs sains (HD) et de patients atteints de MM aux différents stades de la maladie (diagnostic, rechute et rémission sur 2 ans). Nos résultats présentent les différences d'expression génique entre les MSC de HD et les MSC de MM. De façon surprenante le profil transcriptomique des MSC est très similaire aux différents stades du MM et plus particulièrement après le traitement (rechute et rémission). Ces données suggèrent que l'altération d'expression génique des MSC, tout au long du développement du MM, peut persister même en l'absence de signe clinique. Le contact des PC avec les MSC pourrait conduire à une modification pérenne du transcriptome des MSC. La valeur pronostique de cette variation d'expression génique des MSC lors du développement des MM reste à déterminer.

## **TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS ACROSS MULTIPLE MYELOMA STAGES**

Multiple myeloma (MM) is a B-cell malignancy characterized by clonal expansion of malignant plasma cells (PC) within the bone marrow (BM). MM patients often experience multiple relapses due to the presence of chemo-resistant residual MM clones and there is a critical need to understand the mechanisms that regulate MM chemo-resistance and relapse. The interactions between BM cells and malignant PCs play an essential role in MM growth and survival. Mesenchymal stromal cells (MSC) are multipotent BM stromal cells, able to differentiate into osteoblasts and adipocytes that support malignant PC growth through released factors. A better understanding of the role played by these cells in MM drug resistance and relapse is now required. To address this question, we performed a transcriptomic analysis of MSC isolated from healthy donors (HD), and MM patients at different stages of the disease including diagnosis, relapse and after a 2 years remission period. Our results reveal important differences in gene expression between HD and MM MSC. Surprisingly, the transcriptomic profile of MSC was very similar across the different MM stages: relapse or remission. These data reveal that the alteration in MSC gene expression associated with MM development can persist even in the absence of clinical sign of the disease. This suggests that a deep imprinting of MSC cellular program occurs by the contact with MM PCs. This program could be responsible for myeloma relapse even after a long period of time.

### **DISCIPLINE**

Cancérologie, Hématologie et biologie cellulaire

### **MOTS-CLES**

Cancer, Myélome Multiple, Cellules Stromales Mésoenchymateuses, Microenvironnement Tumoral, Hématologie, Analyse Transcriptomique

### **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE**

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole

1, avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9

INSERM U1037 : Equipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

## REMERCIEMENTS

### *Au président du jury*

#### **A monsieur le Professeur Nicolas SEVENET**

En premier lieu pour avoir répondu présent et me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Mais aussi, pour m'avoir si bien accueilli dans votre équipe à l'institut Bergonier, de m'avoir fait confiance pour effectuer de nombreuses analyses sur la maladie de Cowden, de m'avoir initié à la génétique et emmené dans de très beau congrès à Bordeaux. J'ai vraiment été très heureuse de travailler avec vous sur le début de mon internat.

### *Au directeur de thèse*

#### **A madame Bettina COUDERC**

Je ne te remercierai jamais assez d'avoir encadré ces longs travaux de thèse, de m'avoir si bien accueilli et montré la voie mais surtout la réflexion scientifique à avoir. Bien entendu aussi pour toutes tes qualités humaines, d'avoir été une mère pour moi, d'anticiper toutes les choses auxquelles je ne pense pas (« mais tu veux faire un post doc à l'étranger... mais ton amoureux pourra te suivre ?! »), d'être toujours là pour me relire, me conseiller, m'aiguiller, à n'importe quel moment, de m'avoir remonté le moral dans les moments difficiles. Mais aussi bien sur le plan scientifique, de m'avoir appris le vocabulaire scientifique, la transduction, de m'avoir trimbalé dans des supers congrès au Portugal, de m'avoir soutenue sur toutes mes idées loufoques de nouvelles manip à faire. J'en oublie sûrement beaucoup mais je me rattraperai sur la prochaine thèse. Et bien sûr ta plus grande qualité, ta gentillesse et ta bienveillance envers n'importe qui, qui resteront pour moi un exemple pour toujours.

### *Aux membres du Jury*

#### **A madame Jill CORRE**

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Un grand merci pour nous avoir accueillie avec Bettina dans notre phase de transition d'équipe, de nous avoir proposer ce beau projet sur le microenvironnement du MM. Malgré notre éloignement géographique tu as quand même su rester présente et surtout me former sur la rigueur que tu as dans le travail, l'écriture et la présentation des résultats. Pour finir un grand merci pour ta bienveillance, pour m'avoir, du mieux que tu pouvais, aidé et défendue et bien sûr présentée aux bonnes personnes aux bons moments. Pardon par avance pour les fautes d'orthographe qu'il restera peut-être dans ce manuscrit.

#### **A madame Elina WOLFF**

Merci mille fois d'avoir accepté d'être dans mon jury de thèse. Cf A mes amis de longue date

## **A mes amis de Bordeaux**

Les premiers l'équipe de Haut Leveque, des amis de tous les horizons. Des personnes qui m'ont énormément appris, moi bébé interne pas vraiment habituée à la distri et à faire des gardes parfois terrifiantes toute seule dans cette grande pharmacie. **Anaëlle** et **Camille**, mes copines de la pause qui sont restées là pour la première garde, **JM** pour toute le petit café (dans sa c...) et **Vincent** pour ta rigueur dans ton travail, **Rachelle** pour nous avoir aider à faire quelques choses de nos journées et **Mr S** pour m'avoir fichu unes de ses trouilles pendant ma première garde mais aussi pour nous avoir toujours fait bien rire pendant ses 6 mois. Bien sûr à mes amis co-internes de haut Leveque que je garderai toujours dans mon cœur, maman **Manon**, maman **Caro**, maman **Camille** et heureusement pas maman **Elina** et **MarineD** (il en faut bien qui ne soient pas encore maman) et que continuerai toujours à venir embêter le temps d'un WE à Bordeaux.

Bien sûr **Camille G/B** ma best génialissime co-interne ever, avec un début difficile (« ma co-interne c'est vraiment cette meuf BCBG ?! je sens que ces 6 mois vont être long » « olala mais c'est quoi cette pouffe blonde beaucoup trop bronzée en short la ?! ») et puis l'épisode du premier jour, de cet écureuil (paix à son âme), de ce co-voiturage de tous les jours, de nos interminables pauses thé, de notre découverte qui fut une vrai et belle rencontre d'une fille tellement géniale avec un cœur d'or, immense, toujours positive et prête à te trouver une solution à tout. Finalement le plus dur a été de se quitter, de finir ce stage et de déménager, la séparation a été dur mais ne nous a pas totalement éloigné et j'en suis tellement heureuse. Tu resteras bien entendu ma grande amie bordelaise que je n'aurai jamais pensé avoir.

Pour finir ce paragraphe sur Bordeaux, mon 2<sup>ème</sup> stage, ma famille de Bergo, des personnes formidables et humaines, **Eglantine** ma copine sportive, **Jennifer** la première bio-info que j'ai rencontré, **Virginie** qui m'a fait découvrir les consultations d'oncogénétique et bien sur toute l'équipe qui m'a appris à designer des primers et faire mes premières PCR.

## **A mes amis du labo (de l'équipe 17 à l'équipe 13)**

Mes Mentors, **Augustin** et **Benoit**, merci de m'avoir montré la voie, conseillée en toute occasion mais aussi fait bien rigolée quand il le fallait dans ces dernières années. Merci à vous 2 de m'avoir transmis toutes vos connaissances sur les MSC et sur les blagues toujours déplacées, de m'avoir conseillée sur les choses à foire ou pas pour mon avenir et bien sûr aider à devenir la scientifique je suis aujourd'hui.

Merci à toute l'équipe 13 pour nous avoir accueilli dans notre changement d'équipe, aux **techniciens de l'UGM** pour m'avoir si bien expliqué votre quotidien et appelé régulièrement pour les prélèvements de patients. A toute l'équipe « coté recherche » pour m'avoir soutenue quand les résultats négatifs se succédaient, **Marianne**, nos petites rando avec les garçons mais aussi ton aide sur « la cytométrie et l'immunologie pour les nuls », **Andréa** pour m'avoir si bien montré et formé en animalerie, en blagues bizarre et autres expressions Françaises, **MVMJJ**, qui m'a montré et formé sur la voie des MSC et de l'ortograff, **Nadège**, qui m'a toujours fait comprendre qu'il y avait plus grave dans la vie mais aussi pour m'avoir si bien enseigné tout ton savoir murin, **Tchoupi**, pour m'avoir tellement fait rire ce jour où tu étais avec Axel au téléphone et que burp..., **Sousou** pour toutes tes connaissances et ton

savoir que tu partages toujours sans compter et bien sûr **Ludo**, le chef-cool pour ta connaissance et ton savoir infini et pour m'avoir sorti du pétrin quand il le fallait. Il ne faudrait pas oublier « l'autre côté » ma Laura des chats merci mille milliards de fois pour ton écoute immense et innombrable, tes analyses et tes conseils bio info tout aussi immense et innombrables (même pendant tes congés...), mais aussi ma follow de Lindy ! A **Lydia**, qui a trouvé que le nord c'était plus sympa que le sud, je t'attends pour ouvrir un hôpital à Sain-jean. Un merci aussi aux bionifo **Julien** toujours présent pour un petit café, maman **Manon** jamais la mercredi, **Christophe** et **bad appart** qui sont toujours là quand on a besoin. A **Laure** pour ta sincérité, ton honnêteté, ta rigueur et ta justesse face à toute épreuve. A **Sab**, merci mille fois pour ton soutien dans ces moments où la vie nous paraît parfois si dur, merci de nous avoir tant fait rire avec tes ressemblances.

### **A mes amis du master**

Ma **Nina** d'amour, **CamilleT**, **Laura macarons** et **Laura BB** merci pour toutes ces supers soirées, pour votre soutien, vos bons conseils, les macarons, de m'avoir attendue pour manger quand j'avais 1h de retard bref merci d'avoir été là.

### **A mes amis de la fac**

Merci mon **Corentin**, mon constantin l'africain, mon coco, mon bibi d'amour pour tous ces moments que nous avons vécu ensemble, ces TP à moitié bourré mais toujours préparés, ces quelques moments de musique et ce beau voyage au Laos. Merci mes supers pétasses, ma **vulvine d'amour**, mon **Jb d'amour** (Mr KK te passe le bonjour), mon **Grégou chat** pour toutes ces belles années, ces belles soirées, ces beaux déguisements, ces beaux moments de révisions avec lili-pute ces quelques septembrage ensemble. Merci aussi à **Lulu** et **Sarah** avec qui j'ai cravaché pendant ces 2 années d'internat... Le cake aux olives restera gravé. A **Marine B** pour ces belles vacances en Espagne et ses longues heures de révisions.

### **A ma team Toucan**

**Tiph** et **Ludo**, mes petits Toucan, sans le savoir une amitié est née sur les bords de la piscine, vous avez toujours été là. Merci de votre bonne humeur, de votre joie de vivre et de ses cours de natation qui ont permis cette belle rencontre.

### **A mes amis de longue date**

**CamilleN** et **Margaux**, ça y est je peux maintenant le dire les études sont enfin FINIE. Ça fait bizarre de dire ça mais ça y est ces interminables études sont clôturées par cette thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de tous ces moments que nous avons partagé, de nos années lycées en passant par la fac et jusqu'à la vie active. Et aussi un grand merci à mon **Vivian** bien sûr, mon acolyte de ces innombrables voyages dans les pays européens.

**CamilleP** te souviens-tu de notre si belle rencontre aux cours Esquirol un jour de pluie avec un parapluie puis perdu de vue puis finalement copine de panier de légumes puis finalement colok avec tomtom l'ours puis finalement véritablement best colok friend for ever. Et **Elina** bien entendu, une rencontre simple au départ qui s'est intensifiée sur une discussion dans mon garage à Bordeaux pour ne finalement jamais s'arrêter. Merci à vous 2 mes acolytes

pour m'écouter quand ça ne va pas, me relire quand ça ne va pas, me prendre entre 4 yeux pour me dire que ça n'allait pas, bref merci d'avoir été là et d'être toujours là quand on a besoin « d'aller boire un verre » ou me faire sortir de chez moi pour aller à la comtesse avec tomtom. Merci **tomtom** d'être un ours au grand cœur, toujours prêt à râler, à me permettre de m'envoyer en l'air avec un inconnu pour mon anniversaire (je parle de saut en parachute), merci pour m'avoir appris à skier au chalet, d'être venu t'éclater à Tahiti et de m'avoir fait découvrir les PQR.

## *A ma famille*

### **A mes parents, mes frères et ma sœur**

Merci infiniment pour m'avoir toujours soutenue dans tous mes choix loufoques de vie, de la Flute, à la guitare, en passant par le dessin, le concours des beaux-arts, pour finalement finir pharmacienne. Merci à mes 2 papa **Yvan** et **Hugo** de m'avoir éduqué comme ils ont pu chacun dans leurs pays, d'avoir supporté mes colères, mes cuillères jetées par terre, mes crises d'ado bref de m'avoir toujours aimé quoi que je fasse (même avec des clous de girofle dans les cigarettes). Merci à mes 2 mamans **Joëlle** et **cricri**, même s'il n'en reste qu'une les 2 m'auront élevé et appris à grandir, me maquiller, m'habiller bref être la personne que je suis maintenant, merci de m'avoir toujours soutenue, quoi qu'il arrive, et attendue patiemment que je rentre à la maison le soir... Merci à mes frères et sœurs, **Vass**, **Yona**, **Silhouette** et **Léo**, d'être comme vous êtes et de ne pas changer, surtout toi ma silhouette qui a toujours dit « jamais je ne ferai des études comme toi », je te souhaite bien du courage pour ces belles années d'études que tu vas traverser, je sais que tu seras un bon médecin. Mon petit Yoda, la patrie de la famille, je suis tellement heureuse que tu aie trouvé cette belle voie qui finalement te va si bien. Mon Vass, elle est loin cette vieille époque où tu m'as donné ton ours en peluche et où on jouait aux tortues ninja, tu es devenue un grand pro des waramer qui regarde les étoiles, j'espère que tu trouveras celle qui te mériteras. Mon Léo, si rapide mais si intense, tu resteras à jamais gravé dans mon cœur.

### **A ma famille Alsacienne**

Merci **Jérôme**, **Anne**, **Oriane**, **Dani**, **Cécile**, **Livio**, **Papy** et **mamy** de m'avoir si bien accueillie, si bien intégrée à votre famille, fait découvrir l'Alsace et le monde. Je ne pouvais pas rêver mieux comme belle-famille. Merci pour votre soutien dans toutes les épreuves de la vie. Mais aussi un grand merci à **Bruno**, **Anais**, **Virgile**, **Linda**, **Vincent** et **Claudia**.

### **A mon amour**

Et non je ne parlerais pas de mon chat dans ce paragraphe. Merci pour m'avoir toujours soutenue dans tous mes choix, pour m'avoir remis les idées en places quand il le fallait, pour t'être si bien occupé de moi pendant l'écriture de cette thèse, pour me supporter tous les jours. Merci de toutes tes attentions et même si c'est très gnangnan merci de m'aimer de plus en plus tous les jours.

### **A monsieur KK, mara-belle et bébé Aito**

Non sérieux elle a vraiment écrit des remerciements pour ces chats ?!...



<b>RESUME .....</b>	<b>4</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>6</b>
<b>INDEX DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
I. <b>LE MYELOME MULTIPLE .....</b>	<b>18</b>
A. <i>Diagnostic et pronostic .....</i>	<i>18</i>
B. <i>Formes cliniques.....</i>	<i>21</i>
II. <b>LE TRAITEMENT DU MM.....</b>	<b>24</b>
A. <i>Les chimiothérapies cytotoxiques .....</i>	<i>24</i>
B. <i>L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques .....</i>	<i>27</i>
C. <i>Les thérapies ciblées et traitements ciblant le microenvironnement.....</i>	<i>28</i>
D. <i>Les traitements symptomatiques et prophylactiques .....</i>	<i>36</i>
E. <i>Le schéma thérapeutique.....</i>	<i>36</i>
F. <i>Évaluation de la réponse au traitement.....</i>	<i>38</i>
III. <b>LE MICROENVIRONNEMENT DU MM.....</b>	<b>40</b>
A. <i>Caractéristiques principales des MSC.....</i>	<i>41</i>
B. <i>Thérapies cellulaires utilisant des MSC.....</i>	<i>43</i>
C. <i>MSC et cancer .....</i>	<i>44</i>
<b>ETUDE DES MSC DE PATIENTS DANS LA RECHUTE DU MM .....</b>	<b>50</b>
I. <b>CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....</b>	<b>50</b>
A. <i>Intérêt de l'étude.....</i>	<i>50</i>
B. <i>Objectifs de l'étude .....</i>	<i>51</i>
II. <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>51</b>
A. <i>Sélection des données .....</i>	<i>51</i>
B. <i>Méthodes d'intervention.....</i>	<i>52</i>
C. <i>Méthodes d'analyse.....</i>	<i>57</i>
III. <b>RESULTATS .....</b>	<b>58</b>
A. <i>Choix de la cohorte.....</i>	<i>58</i>
B. <i>Isolement et phénotypage des MSC de patients.....</i>	<i>61</i>
C. <i>Analyses transcriptomiques .....</i>	<i>63</i>
<b>CONCLUSION ET DISCUSSION.....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>79</b>

## INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Les différents traitements du MM .....	35
<b>Figure 2:</b> Schéma thérapeutique "classique" du patient <65ans .....	37
<b>Figure 3:</b> Schématisation de l'isolation des MSC à l'analyse transcriptomique .....	54
<b>Figure 4:</b> Synthèse de l'hybridation sur puces Affymetrix .....	56
<b>Figure 5:</b> Schématisation du recueil des prélèvements de patients .....	61
<b>Figure 6:</b> Expression des marqueurs de surface des MSC .....	62
<b>Figure 7:</b> Heatmap BM-MSC Rechute versus Rémission .....	64
<b>Figure 8:</b> Heatmap des MSC de MM versus donneur sain. ....	66
<b>Figure 9:</b> PCA des MSC de patients atteints de MM versus donneurs sains.....	67
<b>Figure 10:</b> Heatmap des MSC de diagnostic versus post traitement .....	69
<b>Figure 11:</b> Heatmap des MSC de diagnostic versus sain et de post traitement versus sain ...	70
<b>Figure 12:</b> Impact de DKK1 et Wnt sur la différenciation des MSC .....	76

## INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 -</b> Classification ISS revisitée .....	20
<b>Tableau 2 -</b> Critères d'évaluation de la réponse au traitement .....	38
<b>Tableau 3 -</b> Critères de MRD .....	39
<b>Tableau 4:</b> Références des Ac utilisés en CMF .....	53
<b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques des patients inclus .....	58
<b>Tableau 6:</b> Caractéristiques des donneurs sains et des patients au diagnostic .....	60
<b>Tableau 7:</b> Liste des gènes communs aux MSC de MM retrouvés différentiellement exprimés par rapport aux MSC de donneurs sains. ....	72

## LISTE DES ABREVIATIONS

Acronymes et abréviations	Définition
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>AcMc</b>	Ac Monoclonal
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AMM</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>ATU</b>	Autorisation Temporaire d'Utilisation
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>BCMA</b>	Antigène de maturation des LB
<b>BMP</b>	Protéines morphogéniques osseuses
<b>BTZ</b>	Bortezomib
<b>CA</b>	Anomalies chromosomiques
<b>CA-MSC</b>	MSC associées au cancer
<b>CCL2</b>	CC-chimiokine Ligand 2
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CFU</b>	Unités formants des colonies
<b>CGH array</b>	Hybridation génomique comparative
<b>CHU</b>	Centre Hospitalo-Universitaire
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>CR</b>	Rémission complète
<b>CRAB</b>	Hypercalcémie, Insuffisance rénale, Anémie, Lésions osseuses
<b>CS1</b>	Antigène du sous-ensemble1 CD2
<b>CSH</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>CT</b>	Tomographie assistée par ordinateur
<b>CXCL12</b>	CXC-chemokine ligand 12
<b>D BM-MSC</b>	MSC de moelle osseuse provenant de patients au diagnostic
<b>del(17p)</b>	Délétion 17p
<b>DKK1</b>	Dickkopf-1
<b>DPI</b>	Dossier Patient Informatisé
<b>DXM</b>	Dexaméthasone
<b>ER BM-MSC</b>	MSC de moelle osseuse provenant de patients en Rechute précoce
<b>F-</b>	Fraction négative
<b>F+</b>	Fraction positive
<b>FC</b>	Fold change d'expression
<b>FGF-2</b>	Facteur de croissance basique fibroblaste
<b>FISH</b>	Hybridation In Situ Fluorescente
<b>G-CSF</b>	Facteurs de croissance hématopoïétique granulocytaire humain

<b>G-MDSC</b>	Cellules suppressives dérivées de granulocytes myéloïdes
<b>GDF15</b>	Facteur de différenciation de la croissance 15
<b>GFP</b>	Protéine Fluorescente Verte
<b>GvHD</b>	Maladie du greffon contre l'hôte
<b>HD BM-MSC</b>	MSC de moelle osseuse provenant de donneurs sains
<b>HD-MSC</b>	MSC de donneurs sains
<b>HGF</b>	Facteur de croissance hépatocytaire
<b>HLA-DR</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>IFG1</b>	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
<b>IFM</b>	Intergroupe Francophone du Myélome
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IMiDs</b>	Immunomodulateurs
<b>IMWG</b>	L'International Myeloma Working Group
<b>InVS</b>	Institut de Veille Sanitaire
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>ISS</b>	Système de Staging International
<b>IUCT-O</b>	Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole
<b>LDH</b>	Lactate Déshydrogénase
<b>LT/LB</b>	Lymphocytes T/ Lymphocytes B
<b>MGUS</b>	Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée
<b>MM</b>	Myélome Multiple
<b>MM-MSC</b>	MSC de Myélome Multiple
<b>MRD</b>	Maladie résiduelle minimum
<b>MSC</b>	Cellules stromales mésenchymateuses
<b>NGS</b>	Séquençage de Nouvelle Génération
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PBMC</b>	Cellules mononucléaires de sang périphérique
<b>PCA</b>	Analyses en composantes principales
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>PFS</b>	Survie sans progression
<b>POEMS</b>	Polyneuropathique, Organomégalie, Endocrinopathie, protéine Monoclonale et Signes cutanés
<b>PR</b>	Réponse partielle
<b>PTH</b>	Prothèse totale de hanche
<b>R BM-MSC</b>	MSC de moelle osseuse provenant de patients en Rémission
<b>sCR</b>	Rémission complète stringente
<b>SDF1</b>	Facteur dérivé du stroma 1
<b>SLiM</b>	Soixante pourcent, ratio de chaînes légères, IRM
<b>SNP-array</b>	Détection des polymorphismes touchant un nucléotide

<b>t(4;14)</b>	Translocation (4 ;14)
<b>tPA</b>	Activateur tissulaire du plasminogène
<b>TEP-CT</b>	Tomographie par émission de positons avec CT
<b>TGFβ</b>	Facteur de croissance transformant-β
<b>UGM</b>	Unité onco-Génomique du Myélome
<b>VCAM1</b>	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance Endothélial Vasculaire
<b>VGPR</b>	Réponse partielle de bonne qualité
<b>VTD</b>	Velcade Thalidomide Dexamethasone
<b>β2m</b>	β2 microglobuline

## INTRODUCTION

Le Myélome Multiple (MM) est une pathologie de la personne âgée affectant 4000 nouveaux patients par an en France. Depuis sa découverte en 1844 par Henry Bence Jones par la présence de protéines dans les urines puis décrit en 1880 par Otto Kahler, qui lui donne le nom de maladie de Kahler, de nombreux traitements ont été envisagés. Ce n'est qu'en 1958 que l'on commence à traiter efficacement le MM avec le melphalan qui sera associé en 1962 à la prednisone. Ce traitement restera pendant plusieurs années une référence thérapeutique, jusqu'à l'arrivée de la greffe de moelle osseuse dans les années 1980. Les chimiothérapies cytotoxiques telles que le melphalan, classiquement utilisées dans le MM comme dans d'autres types d'hémopathies malignes ou de cancers solides, allongent la durée de vie du patient. Malgré tout, ces médicaments exposent à des effets indésirables graves et ne permettent pas de rémission complète dans le cadre du MM : on parle alors de résistance au traitement.

Depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, pour pallier à ces résistances et limiter la survenue d'effets indésirables induits par les médicaments, la recherche scientifique vise à améliorer la façon de cibler les cellules tumorales. Ce ciblage peut être obtenu soit en caractérisant la physiologie de la tumeur pour l'éradiquer plus spécifiquement, soit en affectant les cellules qui l'aident à proliférer et qui appartiennent à ce que l'on appelle le microenvironnement tumoral.

Pourquoi ces 2 nouvelles stratégies thérapeutiques sont-elles envisagées :

- La cellule tumorale a comme particularité de ne jamais mourir, ce qui la rend très sensible aux signaux de mort cellulaire, aussi appelés signaux pro-apoptotiques. En 2004, apparaissent les premiers médicaments inhibiteurs du protéasome et notamment le bortezomib. Ces médicaments ciblent plus spécifiquement la cellule tumorale : en inhibant le protéasome, ils bloquent sa progression dans le cycle cellulaire et induisent la mort par apoptose de la cellule tumorale.
- Le microenvironnement tumoral constitue un enjeu pour le traitement de différents cancers. Il est composé de différents types cellulaires qui constituent des cibles possibles pour de nouvelles thérapies. Vers la fin des années 1990, de plus en plus d'études montrent que la tumeur résiste au traitement en échappant à la reconnaissance et à l'élimination par le système immunitaire, c'est-à-dire à l'immunosurveillance. C'est dans ce contexte qu'arrivent les médicaments

immunomodulateurs avec l'utilisation du thalidomide. Ce type de thérapie permet d'exploiter les mécanismes naturels de défense du patient en stimulant le système immunitaire déjà présent. Les anticorps monoclonaux ont été découverts dans les années 1980, mais ce n'est que depuis quelques années qu'ils sont utilisés dans le cadre du MM. Le daratumumab a fait preuve de son efficacité clinique ; ce médicament combine une action spécifique sur la cellule tumorale (en se liant au marqueur CD38 surexprimé par les plasmocytes tumoraux) et sur son microenvironnement (il utilise le système immunitaire déjà présent pour tuer la cellule qu'il a préalablement ciblé).

A ce jour, le traitement standard reste pour les patients les plus jeunes une induction à base de chimiothérapies, puis une autogreffe et enfin une période de consolidation par chimiothérapies. Pour les patients plus âgés, chez qui l'autogreffe ne sera pas possible, une chimiothérapie seule est proposée. Ces traitements sont réalisés dans le cas où le patient ne participe pas aux essais thérapeutiques.

L'efficacité de ces thérapies reste limitée car environ 75% des patients rechutent dans les 5 ans suivant le diagnostic(1).

En ce qui concerne la cellule tumorale, de nombreuses équipes travaillent sur les anomalies cytogénétiques présentes sur les plasmocytes tumoraux pour essayer de prédire une mauvaise réponse au traitement médicamenteux. Ces anomalies peuvent être liées à l'acquisition de délétions, gains, translocations chromosomiques ou trisomies sur les plasmocytes tumoraux. D'autres stratégies cherchent à cibler de façon plus précise la tumeur notamment via l'expression à la surface cellulaire de certains clusters de différenciation (CD) comme par exemple le CD138.

En ce qui concerne l'implication du microenvironnement, l'étude des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et de leur rôle dans le développement du MM suscite de grands espoirs. Les MSC sont des cellules multipotentes, plastiques et capables de moduler leur activité en fonction de leur environnement. Elles ont différents rôles dont celui de se différencier, entre autres, en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes, mais peuvent aussi moduler l'immunité par sécrétion de facteurs et cytokines ou encore favoriser l'angiogenèse. Dans les années 2000, les premières analyses phénotypiques des MSC isolées de patients atteints de MM tendent à montrer que ces cellules sont différentes de celles issues de donneurs sains. En effet elles perdent leur capacité de différenciation en ostéoblastes et sont

moins capables d'inhiber l'immunité. De plus, elles sécrètent différentes cytokines et facteurs de croissances leur permettant de supporter la croissance tumorale. L'ensemble des travaux publiés ont été réalisés au stade du diagnostic de la maladie. Peu de publications se réfèrent au phénotype ou aux implications des MSC au cours du traitement et/ou chez les patients en rechute.

Le but de l'étude présentée ici était d'isoler des MSC de patients au cours du traitement pour essayer de comprendre leur impact sur la tumeur et notamment chez les patients en rechute. Une cohorte de patients a été mise en place, les MSC ont été extraites de prélèvements de moelle osseuse en vue de réaliser une étude transcriptomique. Un transcriptome a donc été corrélé aux différents profils des patients.



## I. Le Myélome Multiple

Le Myélome Multiple des os ou maladie de Kahler est une hémopathie lymphoïde maligne caractérisée par le développement d'un ou plusieurs clones de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse(2,3). Cette pathologie touche principalement la personne âgée et reste, à l'heure actuelle, incurable. Elle représente 2% de l'ensemble des cancers et 10 à 12% des hémopathies malignes(4,5). En 2012, le nombre de nouveaux cas en France est estimé à 4 900 dont 52 % survenant chez l'homme, avec un âge médian de survenue de 75 ans chez la femme et 72 ans chez l'homme. D'après l'Institut de veille sanitaire (InVS), la survie nette à 5 ans reste faible, 51% chez l'homme et 55% chez la femme, mais tend à progresser avec l'arrivée de nouvelles thérapies(6).

### A. Diagnostic et pronostic

#### 1. Signes diagnostiques cliniques et biologiques

Le diagnostic du MM repose sur la mise en évidence des conséquences de la maladie sur les aspects biologiques et cliniques (7). Les critères diagnostiques du MM sont (8) :

- La présence de plus de 10% de plasmocytes dans la moelle osseuse ;
- La présence d'au moins un des critères SLiM-CRAB ci-dessous, nouvellement établis en 2014 :
  - Critères SLiM (soixante pourcent, ratio des chaînes légères, IRM) par la présence d'au moins un biomarqueur de malignité :
    - Plus de 60% de plasmocytes malins dans la moelle ;
    - Ratio des chaînes légères libres impliquées/non impliquées >100,
    - Au moins une lésion focale sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM).
  - Critères CRAB (Calcémie, Insuffisance Rénale, Anémie, lésions osseuses) par la preuve de l'altération des organes pouvant être attribuée aux plasmocytes malins :
    - Hypercalcémie : Calcium sérique  $\geq$  à 2,75mmol/L (>11 mg/dL) ;
    - Insuffisance rénale : Clairance de la créatinine <40mL/min ou une créatinine sérique > à 177  $\mu$ mol/L (2mg/dL) ;

- Anémie : Hémoglobine < 100 g/L ou perte de plus de 20g/L par rapport à la limite inférieure de la norme ;
- Lésions osseuses : Présence d'au moins une lésion ostéolytique sur radiographie, tomographie assistée par ordinateur (CT) ou, tomographie par émission de positon (TEP-CT).

Le MM est marqué par l'accumulation de plasmocytes tumoraux (au moins 10%) dans la moelle osseuse, retrouvée lors du myélogramme. Cette infiltration médullaire va entraîner une anémie visible sur un hémogramme ainsi qu'une insuffisance médullaire globale et donc une altération de l'état général.

Les plasmocytes, qu'ils soient malins ou sains, produisent des protéines appelées anticorps et jouent un rôle important dans l'immunité. Ces anticorps, ou immunoglobulines, sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées par des ponts disulfures. Ils sont divisés en 5 isotypes selon leur type de chaînes lourdes : les immunoglobulines (Ig) IgG, A, D, E ou M. Environ 50 % des MM sont d'isotype IgG, 20 % d'isotype IgA et 20 % sont de type urinaire (à chaînes légères).

Pour diagnostiquer la maladie, on utilise différentes techniques :

- L'immunofixation ou l'immunoélectrophorèse des protéines sériques permet de typer la protéine monoclonale pour sa chaîne lourde et sa chaîne légère ;
- L'électrophorèse des protéines urinaires permet de mettre en évidence une protéinurie à chaînes légères appelée protéinurie de Bence Jones. L'immunofixation de ces mêmes protéines permet de préciser le type de protéine : kappa ou lambda. Concernant les chaînes légères, le type kappa est 2 fois plus fréquent que le type lambda. Dans ce cas, les Ig à chaînes légères s'accumulent et sont éliminées par le rein provoquant ainsi une insuffisance rénale ;
- Le dosage de  $\beta_2$  microglobuline ( $\beta_2m$ ) sérique permet de refléter la masse tumorale : son taux est donc élevé chez les sujets atteints de MM.

Parmi les symptômes cliniques, on retrouve la présence de lacunes osseuses qui provoquent le plus souvent une hypercalcémie, par dégradation de l'os. Cette hypercalcémie peut être responsable d'une insuffisance rénale liée à la réabsorption passive de calcium par le rein. On retrouve donc ce phénomène associé à une augmentation de la créatininémie.

D'autres critères biologiques apparaissent secondairement : une augmentation de la protéine C réactive, de la lactate déshydrogénase et une hypoalbuminémie (9).

Suite au diagnostic de la maladie, le médecin évalue le pronostic du patient grâce à la classification de l'International Staging System (ISS) et depuis peu grâce à l'analyse des anomalies cytogénétiques.

## 2. Facteurs Pronostiques

Plusieurs classifications ont été successivement utilisées pour mesurer en routine l'agressivité du MM :

- La classification de Durie et Salmon est la première à avoir été validée. Elle tient compte des critères biologiques présentés précédemment : le taux d'hémoglobine, la calcémie, la présence de lésions ostéolytiques, le taux d'Ig monoclonal sérique ou urinaire et la créatininémie ;
- L'ISS est la classification pronostique qui fait référence actuellement. Elle est basée sur une analyse uni- et multivariée ainsi que 3 types de modélisations réalisées sur plusieurs groupes de patients. Parmi tous les facteurs pronostiques utilisés, 2 tests montrent un pouvoir prédictif puissant concernant la moyenne de survie des patients mais sont aussi utilisables en routine et peu coûteux : le dosage dans le sang de la  $\beta 2m$  et de l'albumine (7,10). En 2015, l'ISS a été révisé pour inclure les anomalies chromosomiques (CA) et le dosage sérique de la lactate déshydrogénase (LDH). Ces 4 facteurs permettent de classer la maladie en 3 stades(11). Ils sont présentés dans le **Tableau 1** ;
- D'autres facteurs influencent le pronostic de la maladie : l'âge du patient, les comorbidités associées ainsi que la réponse au traitement.

	Stade I	Stade II	Stade III
$\beta 2m$	<3.5mg/L	Ni stade I	$\geq 5.5mg/L$
Albumine	$\geq 3.5g/dL$	ni stade	
Anomalies chromosomiques	Pas de haut risque de CA	III	Présence de délétion del(17p) et/ou translocation t(4 ;14) et/ou translocation t(14 ;16) ou LDH supérieur à la normale dans le sérum
Lactate déshydrogénase	Normal LDH		

**Tableau 1** - Classification ISS revisitée

### 3. Anomalies génomiques

Certaines spécificités du plasmocyte malin peuvent avoir une influence majeure sur le pronostic du patient. C'est pour cela que le pronostic est également étroitement associé aux anomalies cytogénétiques initiales et acquises lors des rechutes. Ces anomalies sont détectées sur les plasmocytes triés de moelle osseuse de patients par Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH), détection des polymorphismes touchant un nucléotide (SNP-array) ou séquençage de nouvelle génération (NGS).

Les anomalies cytogénétiques retrouvées associées aux plasmocytes peuvent être de bon ou mauvais pronostic. Par exemple, les trisomies 3 et 5 ont été décrites comme orientant vers un bon pronostic(12). D'autres anomalies, comme les translocations (t(4 ;14) et t(14 ;16)), les délétions (del1p32 et del17p), le gain chromosomique (gain 1q) et la trisomie 21, ont été décrites comme orientant vers un mauvais pronostic(12–14).

### B. Formes cliniques

Le diagnostic de cette maladie est à rechercher devant divers tableaux cliniques (10,15)

#### 1. Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS)

Le Myélome asymptomatique, aussi appelé « état pré-myélomateux indolent » ou Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée (MGUS)(16–18), est retrouvé présent dans 3 à 4% de la population générale après 50 ans (19). Le taux d'évolution vers un MM est de 0,5 à 1% par an selon le type de MGUS.

Il est classé selon 3 sous types :

- MGUS Non IgM, définit par la présence de :
  - Protéines monoclonales sériques < 30g/L ;
  - Plasmocytose médullaire < 10% ;
  - Absence de dommage d'organes en lien avec la dyscrasie plasmocytaire (critères CRAB ou amylose).

Son taux de progression est de l'ordre de 1% par an (10,20) ;

- MGUS IgM, définit par la présence de :
  - Protéines monoclonales type IgM sériques < 30g/L ;
  - Lymphoplasmocytose médullaire < 10% ;
  - Absence de dommages d'organes en lien avec la dyscrasie lymphoplasmocytaire (anémie, hyperviscosité, ...).

Son taux de progression est de l'ordre de 1 à 5% par an (21) ;
- Light chain-MGUS, définit par la présence de :
  - Ratio anormal des chaînes légères libres <0.26 ou >1.65 avec  $\kappa$  élevée chez les patients avec ratio > 1.65 ou  $\lambda$  élevée chez les patients avec ratio <0.26 ;
  - Absence d'Ig monoclonale entière en immunofixation ;
  - Plasmocytose médullaire < 10% ;
  - Absence de dommage de type CRAB ou Amylose ;
  - Protéines Mc urinaires < 500mg/24h.

Son taux de progression est de 0 à 3% par an (22).

Il précède dans 99 % des cas le MM.

## 2. MM (a)symptomatique

La forme asymptomatique, dite aussi MM indolent ou Smouldering Multiple Myeloma, correspond à une forme sans signe clinique qui a cependant une biologie modifiée par rapport à la normale (décrite ci-dessous), associée à une augmentation des taux sanguins d'Ig (supérieure à 30g/L) et/ou de plasmocytose médullaire (supérieur à 10%).

La forme symptomatique est associée à des signes cliniques spécifiques de la maladie qui découlent de l'envahissement plasmocytaire médullaire. Il a été précédemment détaillé dans la partie diagnostic (critères SLiM-CRAB).

Plusieurs formes sont retrouvées dans les 2 cas selon l'Ig sécrétée par le plasmocyte malin. Elle sera, soit à chaîne lourde, IgA ou IgG, retrouvée dans le sang, soit à chaîne légère, retrouvée dans les urines (2,3).

### 3. Leucémie à plasmocytes

La leucémie à plasmocytes représente 2 à 4% de l'ensemble des MM et est une forme plus agressive que le MM symptomatique. Dans 60% des cas, elle est observée au diagnostic de la maladie (nommée ainsi primitive) et 40% des cas en fin de maladie (dite secondaire). On retrouve un nombre de plasmocytes sanguins supérieurs à 20% (2 g/L) (23,24).

### 4. Myélome ostéocondensant et plasmocytome solitaire

Le MM ostéocondensant (ou ostéosclérique) est très rare et s'associe à une polyneuropathie dans 30 à 50 % des cas. On y retrouve une fibrose et une ostéosclérose des lamelles des os à la place de la lyse de l'os. Il est aussi appelé POEMS syndrome pour son atteinte Polyneuropathique, avec présence d'une Organomégalie, Endocrinopathie, de protéine Monoclonale et de Signes cutanés (25).

Le plasmocytome solitaire représente 3 à 5% des néoplasies plasmocytaires et correspond à une prolifération localisée de plasmocytes monoclonaux malins au niveau osseux ou extra-osseux. Il est caractérisé par :

- Lésions isolées de l'os (ou d'un tissu mou) avec plasmocytes sur biopsie ;
- Moelle osseuse normale ou plasmocytose médullaire clonale inférieure à 10% selon le type de plasmocytome solitaire ;
- Absence d'anomalie squelettique du rachis et du bassin sur l'Imagerie par résonance magnétique ou scanner ;
- Absence de critères CRAB ou amylose.

Son taux de progression vers un MM est de l'ordre de 10% sur 3 ans (26).

## II. Le traitement du MM

La prise en charge du MM a progressé ces dernières années avec l'introduction de nouvelles molécules faisant s'élever la survie à 5 ans de 29,8% à 39,6% en Europe entre 1997/99 et 2006/08 (27).

Seuls les patients symptomatiques sont traités car le rapport bénéfice/risque du traitement chez les patients asymptomatiques (MGUS le plus souvent) est faible(16,28). La prise en charge du MM comprend une chimiothérapie pouvant être associée à une greffe selon l'âge du patient. Les différentes classes de chimiothérapies utilisées seront dans un premier temps détaillées puis dans un second temps les schémas thérapeutiques à suivre en fonction de l'âge du patient seront énoncés.

### A. Les chimiothérapies cytotoxiques et glucocorticoïdes

La plus ancienne thérapie médicamenteuse contre le cancer est l'introduction des chimiothérapies cytotoxiques. Elle a permis de traiter les patients atteints de MM avec l'association de différents médicaments dont ceux utilisés actuellement, les alkylants et les corticoïdes.

#### 1. Les alkylants

Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe de médicaments anticancéreux. Leur développement découle des effets du gaz moutarde utilisé pendant la première guerre mondiale. Leur composition électrophile est capable d'interagir avec des composés possédant des radicaux nucléophiles, retrouvés notamment dans les acides nucléiques. Ces molécules peuvent alkyler de façon covalente les bases de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Cette liaison covalente peut être monovalente ou bivalente et, dans ce cas, entraîner des ponts intra ou inter-brins. La cytotoxicité du traitement provient de l'alkylation des cellules ayant un fort taux de multiplication comme les cellules tumorales. En effet, ces agents altèrent des processus indispensables à la division cellulaire, la réplication et la transcription, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, les lésions induites par cette alkylation produisent souvent des cassures simple ou double-brins induisant l'entrée en apoptose de la cellule. Ces agents alkylants sont subdivisés en 8 sous-classes :

- Les moutardes à l'azote, tels que le melphalan, chlorméthine, chlorambucil et méchlorétamine, induisent préférentiellement des liaisons inter-brins ;
- La sous-classe des oxazaphosphorines composée du cyclophosphamide et de l'ifosfamide. Ils exercent leur action cytotoxique majoritairement par formation de ponts inter-brins ;
- Le témozolomide et la dacarbazine sont des composés monovalents (pas de formation de pont intra ou inter-brins), appartenant à la sous-classe des triazènes et hydrazines, qui forment des adduits sur l'ADN responsables de leur activité cytotoxique ;
- Les molécules appartenant aux éthylène-imines, comme le thiotépa, l'altrétamine et la mitomycine C, forment des ponts intra ou inter-caténaux au niveau de l'ADN induisant la mort cellulaire ;
- La sous-classe des nitroso-urées comprenant la carmustine, la lomustine, la fotémustine, la bendamustine et la streptozocine, peut former des ponts inter-brins induisant une cytotoxicité.
- Les alkyles alcanes sulfonates ou moutardes soufrées sont représentés par le busulfan et le pipobroman. Ils exercent leur activité cytotoxique en formant des ponts intra ou inter-caténaux ;
- Les sels de platine ou les organoplatines, tels que le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine, sont des agents alkylants exerçant leur activité cytotoxique par formation de ponts intra ou inter-brins.

Dans le cadre du MM, les antinéoplasiques cytotoxiques immunosuppresseurs utilisés sont le cyclophosphamide (ENDOXAN®) et le melphalan (ALKERAN®)(2,29). La bendamustine (LEVACT®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en mai 2016(30) en première ligne de traitement en association avec la prednisone chez les patients de plus de 65 ans présentant une neuropathie au diagnostic et non éligible à une greffe autologue (31).



## 2. Les corticoïdes

Le cortex de la surrénale (corticosurrénale) synthétise une trentaine d'hormones appelées corticostéroïdes. Elles se divisent en 3 grands groupes : les minéralocorticoïdes, les gonadocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Ces derniers agissent via un récepteur spécifique, intracellulaire, le récepteur aux glucocorticoïdes. Il est retrouvé dans le cytosol de la cellule sous forme de complexe inactif lié à la protéine de choc thermique et à l'immunophiline. Lors de la liaison du glucocorticoïde libre à son récepteur, le complexe se dissocie et seul l'ensemble ligand-récepteur migre dans le noyau. Cet ensemble interagit avec l'ADN et pourra agir de manière directe ou indirecte sur la transcription de gènes. De manière directe, il induit une augmentation du taux de protéines anti-inflammatoires telles que l'interleukine 10 (IL10), l'annexin1 et la protéine IκB. De façon indirecte, le complexe ligand-récepteur permet l'inactivation de facteurs de transcription (AP1, NF-κB et NF-IL6) responsable de l'effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur des glucocorticoïdes. Les corticoïdes pourront donc exercer leurs effets sur l'immunité et l'inflammation via :

- L'inhibition de la transcription de cytokines pro-inflammatoires ;
- La diminution de l'acide arachidonique (médiateur de l'inflammation) ;
- La diminution de la différenciation des monocytes-macrophages, des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles ;
- L'inhibition de production et de prolifération des lymphocytes T (LT).

Les corticoïdes de référence utilisés en thérapeutique sont la prednisone (CORTANCYL®), la prednisolone (SOLUPRED®), la méthylprednisolone et la dexaméthasone (DXM) (NEODEX®, DECTANCYL®). Ils sont utilisés dans diverses pathologies pour leur effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Dans le MM, la DXM est principalement utilisée en première intention en association (2,32).

## B. L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules dites souches car elles ont la capacité de s'auto-renouveler et se différencier en cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes afin de reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique. Les plasmocytes proviennent des cellules progénitrices lymphoïdes. Une autre façon de cibler la maladie est de l'éradiquer à l'emplacement de sa formation. Dans les années 1970/1980, la greffe de cellules souches fait son apparition en thérapie dans différents cancers hématologiques. Ce n'est qu'en 1996 qu'elle fait son apparition dans le traitement du MM grâce à une étude multicentrique menée par l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) (33).

Le principe de la greffe se déroule en 3 temps. Au départ le sang du patient est enrichi en progéniteurs CD34+ grâce à des facteurs de croissance puis prélevé par cytophérèse et congelé jusqu'à utilisation : on parle alors de greffon. Par la suite, le patient va subir une aplasie médullaire grâce à une chimiothérapie intensive à base de melphalan. Enfin son greffon lui est réinjecté. Cette greffe est dite autologue car les cellules réimplantées proviennent du patient lui-même. Seuls les patients dits « jeunes » (<65-70 ans) peuvent recevoir une greffe, le rapport bénéfice/risque étant plus faible chez des patients plus âgés.

La première étude IFM, publiée en 1996, a été réalisée à Toulouse. Elle a comparé, auprès de 200 patients, l'effet d'une chimiothérapie de haute dose suivie d'une greffe de CSH à une thérapie classique de 18 cycles. L'étude conclut à une meilleure réponse de l'association autogreffe/chimiothérapie contre chimiothérapie seule, avec une survie sans événement sur 5 ans de 28% (*versus* 10% sous chimiothérapie seule) et un taux de survie globale à 5 ans de 52% (*versus* 12% sous chimiothérapie seule)(33). L'étude de phase III, IFM 2009, réalisée sur 700 personnes en France et en Belgique, a permis de mettre en place la stratégie thérapeutique utilisée actuellement dans le MM (décrite en suivant dans la partie I.E.). Elle montre une meilleure survie sans progression (69% *versus* 33%) et une meilleure réponse complète (58 *versus* 46%) dans le bras comportant 3 cycles de chimiothérapie + greffe + 2 cycles *versus* 8 cycles sans greffe(1).

## C. Les thérapies ciblées et traitements ciblant le microenvironnement

Les thérapies cytotoxiques ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et ne permettent pas une éradication complète de la maladie. De plus, elles entraînent un certain nombre d'effets indésirables du fait de leur action sur toutes les cellules, y compris les cellules saines. C'est dans cette optique qu'ont été développées les thérapies ciblées aussi appelées thérapies de « nouvelle génération », le but étant de cibler préférentiellement la cellule tumorale en agissant soit sur les anomalies spécifiques de chaque cellule tumorale, soit sur son microenvironnement. Le microenvironnement tumoral correspond à l'environnement proche de la tumeur et a pour but d'aider les cellules tumorales à se développer.

C'est dans cet objectif que plusieurs classes de thérapies ciblées ont été développées. Elles seront ici présentées selon leur cible et leur mécanisme d'action sur le MM.

### 1. Thérapies ciblant les plasmocytes tumoraux

Ces thérapies innovantes cherchent à cibler des anomalies spécifiques de la tumeur. Elles ont pour but de potentialiser l'effet des chimiothérapies actuellement utilisées et de réduire les effets indésirables causés par l'action non spécifique des cytotoxiques.

#### a) *Les immunothérapies : les anticorps monoclonaux*

Les anticorps monoclonaux (AcMc) sont des molécules produites par le système immunitaire et permettent de déclencher une attaque ciblée. Ils agissent en reconnaissant et en neutralisant des pathogènes mais peuvent aussi induire une cytotoxicité ou une phagocytose des cellules. Ils sont largement utilisés en thérapie notamment dans les cancers, l'isotype IgG étant le plus utilisé (34). Dans les années 1980, ils sont utilisés pour leur reconnaissance de marqueurs spécifiques situés à la surface de la cellule tumorale. Ces AcMc sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures. En 1975, Kohler et Milstein ont créé des traitements à partir d'Ac murins (35). Les effets indésirables étant nombreux, la structure de l'Ac a été changée sur une base plus humanisée voire totalement humaine. Ces changements ont constitué les différentes classes d'AcMc :

- Les murins, nommés « -momab », sont en totalité d'origine murine. Par exemple le muromumab, anti CD20, est utilisé dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens ;

- Les chimériques, nommés « -ximab », composés à 60-70% d'origine humaine. Par exemple l'infliximab, anti TNF $\alpha$  est utilisé dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis ;
- Les humanisés « -zumab », composés à 90% d'origine humaine. On retrouve le bevacizumab, anti VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire) indiqué dans plusieurs cancers solides, notamment dans le cancer du sein métastatique.
- Les humains « -mumab », 100% d'origine humaine. Le daratumumab en fait partie et son utilisation dans le MM est détaillée plus bas.

Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les cellules B malignes expriment le CD20, contrairement aux autres cellules non malignes. Le rituximab, anticorps monoclonal chimérique utilisé dans les leucémies va cibler le CD20 et permettre une éradication plus spécifique de la tumeur.

Les médicaments suivants ont une place dans la stratégie de traitement du MM :

- Dans le cadre du MM, le plasmocyte malin surexprime le CD38 à sa surface. Le daratumumab est un anticorps monoclonal humain de type IgG1 qui se lie préférentiellement au CD38 de la cellule tumorale. Il permet la lyse tumorale *via* une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, une cytotoxicité dépendante du complément ainsi qu'une phagocytose cellulaire dépendante des anticorps. La liaison du daratumumab au CD38 entraîne également une cytotoxicité des cellules immunitaires exprimant CD38, telles que les cellules myéloïdes suppressives et les lymphocytes régulateurs (B et T).

Le daratumumab a obtenu une AMM en février 2018(36), pour le traitement du MM après une première rechute, en association avec une bithérapie par lénalidomide/DXM ou par bortezomib/DXM. Cette indication fait suite aux études CASTOR (37) et POLLUX (38). Il est actuellement utilisé dans l'essai de phase III nommé CASSIOPEIA dans l'objectif d'évaluer sa place en première ligne de traitement du MM.

- L'isatuximab, apparu récemment, il n'a pas encore obtenu d'AMM et bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans le MM en rechute, en 4<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus. C'est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 qui se lie de façon sélective au CD38. Il agit de la même façon que le daratumumab et va en plus inhiber les LT régulateurs et activer les cellules natural killer (NK). En 2019, il fait l'objet de 3 études cliniques de phase III en adjuvant du traitement actuel, en première ligne de traitement (NCT03617731), chez les patients réfractaires ou en rechute (NCT03275285, NCT02990338=ICARIA-MM). Le laboratoire pharmaceutique Sanofi présente des premiers résultats encourageants sur son essai de phase III « ICARIA-MM ». Ils montrent, sur 307 patients réfractaires ou en rechute une réduction de 40% du risque de progression grâce à l'utilisation de l'isatuximab en combinaison avec le pomalidomide et la dexaméthasone(39).
- L'elotuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène du sous-ensemble1 CD2 (CS1) humain qui va déclencher une cytotoxicité dépendante des anticorps. CS1 est une glycoprotéine de surface appartenant à la sous famille CD2 et fortement exprimée par les plasmocytes malins. Il est en cours d'essai de phase I/II en France (FACET HuLuc63-1703) pour évaluer le rapport bénéfice/risque en combinaison avec le lenalidomide et la dexaméthasone chez des patients en rechute de MM(40).

D'autres inhibiteurs ciblant spécifiquement la tumeur sont en cours d'évaluation aux États Unis : les inhibiteurs du cycle cellulaire, de la transcription, des télomérases et des inhibiteurs de aurora kinase.

#### *b) Les CAR-T cells*

Ce sont des LT autologues qui ont été génétiquement modifiés *ex vivo* afin de leur faire exprimer un Récepteurs d'Antigène Chimériques (CAR). Ces derniers sont des récepteurs recombinants qui peuvent à la fois lier l'antigène et activer le LT. Depuis le début des années 2000, 3 générations de CAR-T ont vu le jour (41):

- Les premières générations de CAR étaient seulement pourvues de récepteurs activateurs des LT.
- Les secondes générations ont vu apparaître une double signalisation avec des récepteurs activateurs couplés à des signaux de costimulation.
- Les troisièmes générations combinent au moins 3 domaines de signalisation.

Ces LT, modifiés génétiquement, vont reconnaître et cibler un antigène tumoral spécifique à la surface des cellules. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont rapporté leurs bienfaits dans le traitement des hémopathies malignes, principalement sur des cancers qui touchent les LB, comme le lymphome ou encore la leucémie, en ciblant le CD19 présent à la surface des LB(42). Dans le cas du MM, de nombreuses études de phase I ont vu le jour. Elles cherchent à cibler l'antigène de maturation des LB (BCMA) qui est présent dans la plupart des cas de MM. L'étude NCT02658929 de phase I, évalue la dose de LT à injecter chez des patients réfractaires ou en rechute. 33 patients ont reçu des doses de cellules CAR-T allant de 50 à 800 millions selon différentes phases. Ce traitement semble efficace car 28 patients répondent : 15 sont en réponse complète, 4 patients sont en maladie stable et 1 seul rechute. Malheureusement 6 des 15 patients en réponse complète ont rechuté dans les mois qui ont suivi et on retrouve une PFS de 11,8 mois. 25 nouveaux essais de phase II et/ou III sont actuellement en cours, aux Etats Unis et en Chine, sur de plus grandes cohortes dans le cadre de patients réfractaires ou en rechute de MM. 3 études de phases II (NCT04133636, NCT03361748, NCT03601078) et 1 étude de phase III (NCT03651128) ont commencé en France en collaboration avec les Etats Unis depuis 2017/2018. Ce traitement prometteur n'a, pour l'instant, fait ses preuves que sur des patients ayant subi plusieurs lignes de chimiothérapies et donne des résultats à court terme car les patients rechutent après quelques mois de traitements seulement(43). La présence du système immunitaire reste essentielle dans ce type de pathologie. Or après plusieurs rechutes les patients se retrouvent avec un système immunitaire affaibli et une maladie trop souvent résistante à une immunostimulation.

## 2. Ciblant le microenvironnement et les plasmocytes

### a) *Immunomodulateurs (IMiDs)*

La classe des immunomodulateurs (IMiDs) telles que le thalidomide, le lénalidomide (REVLIMID®) et le pomalidomide (IMNOVID®), entraîne une altération de la production de cytokines, une régulation de la co-stimulation des LT ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK(34). Ces traitements agissent sur la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12) et de protéines pro-angiogéniques (FGF-2 et VEGF)(44). La cible des IMiDs serait une protéine E3 ubiquitine ligase, le céréblon. En présence des IMiDs, le céréblon se lie aux protéines substrats tel qu'ikaros et aiolos, qui sont des facteurs de transcription spécifiques des cellules B. Cela entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome(45). Les protéines ikaros et aiolos sont surexprimées dans les tumeurs malignes lymphoïdes B notamment dans le MM. Les IMiDs modifient le ratio lymphocytaire T circulant chez le sujet sain, diminuant les LT « helper » et augmentant les LT cytotoxiques. Ces médicaments immunomodulateurs augmenteraient le nombre et l'activité cytotoxique des cellules NK impliquées dans l'immunité antitumorale.

Les IMiDs pourraient donc avoir un rôle immunomodulateur mais aussi antitumoral direct en bloquant la prolifération tumorale par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en induisant l'apoptose(44,45).

### b) *Inhibiteurs du protéasome*

Le protéasome joue un rôle important dans la régulation des processus intracellulaires et dans l'homéostasie de la cellule. Ces protéasomes sont présents dans le cytoplasme des cellules. Lorsqu'il y a des protéines anormales ou présentes en trop grand nombre, la cellule a 2 stratégies pour les dégrader : *via* le système lysosomal ou *via* la voie ubiquitine-protéasome. Dans cette dernière voie, les protéines sont marquées par une protéine appelée ubiquitine qui sera reconnue par le protéasome et entrainera la protéolyse. Les cellules cancéreuses quant à elles présentent un dysfonctionnement du cycle cellulaire les rendant insensibles aux signaux de mort cellulaire. Les inhibiteurs du protéasome entraînent un arrêt du cycle cellulaire provoquant ainsi une accumulation de protéines anormales. Cette accumulation de protéines induit la mort par apoptose des cellules tumorales. De plus, de nouvelles études ont

démonstré que ces inhibiteurs du protéasome rendraient les cellules tumorales plus sensibles à la chimiothérapie(46).

Les 2 inhibiteurs utilisés actuellement en pratique inhibent le protéasome en se liant de façon réversible pour le bortezomib (VELCADE®), ou irréversible pour le carfilzomib (KYPROLIS®), sur différents sites du protéasome. Le bortezomib (BTZ) est le premier inhibiteur du protéasome à avoir été utilisé dans le traitement du MM et constitue toujours le traitement de première intention en association(47,48). Le carfilzomib est quant à lui seulement utilisé dans les rechutes en association avec le lenalidomide et la DXM. Il a obtenu une AMM dans cette indication en février 2018(49) suite à l'étude ASPIRE PX-171-009 (50). L'ixazomib (NINLARO®) a obtenu une AMM récemment, en juillet 2017(51), en association au lenalidomide/DXM seulement à partir de la 2ème ligne de traitement. Ces résultats font suite à l'étude de phase III TOURMALINE-MM1 issue d'une cohorte mondiale (Amérique du Nord, Europe et Asie-Pacifique) qui a prouvé son efficacité en adjuvant de l'association lenalidomide/DXM par rapport à l'association seule (52).

### *c) Les inhibiteurs de l'histone désacétylase*

L'état d'acétylation des histones dépend de 2 enzymes : les acétyltransférases d'histone (qui acétylent l'histone pour garder la chromatine ouverte et permettre ainsi la transcription) et les désacétylases d'histone (qui désacétylent, rendant la chromatine fermée et donc une transcription impossible). Les inhibiteurs de l'histone désacétylase sont de nouveaux antinéoplasiques pouvant corriger la dérégulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, cette classe ne cible pas seulement les modifications épigénétiques des histones. De nombreuses études ont montré qu'elles peuvent agir aussi sur l'apoptose, l'angiogenèse mais aussi sur la prolifération et la différenciation des cellules, les rendant utiles dans les cas de cancers (53).

Les inhibiteurs de l'histone désacétylase sont classés en 4 grandes familles : les acides gras à chaînes courtes, les benzamides, les tétrapeptides cycliques et les dérivés hydroxamiques. Seule cette dernière classe est utilisée dans le cadre du MM avec le vorinostat et le panobinostat (FARYDAK®). Une étude de phase III a été réalisée sur la combinaison vorinostat/BTZ versus BTZ seul et montre une meilleure survie sans progression, ou Progression Free Survival (PFS) avec le vorinostat (7,63 mois versus 6,83 mois respectivement). Malgré tout, la survie globale reste identique et les effets indésirables



nombreux (54). Le panobinostat a, quant à lui, obtenu l'AMM en 2016(55) suite à une étude de phase III PANORAMA\_1 (56) et une étude de phase II PANORAMA\_2 (57). Il est depuis indiqué dans le traitement du MM en rechute et/ou réfractaire en association avec le bortezomib/DXM chez un patient qui a reçu au moins 2 lignes de traitements. Il conserve malgré tout, des effets indésirables importants. Il est en cours d'étude de phase II PANORAMA\_3 pour évaluer l'efficacité et 3 différentes doses en association avec bortezomib/DXM.

*d) Autres inhibiteurs : Inhibiteurs de mTOR et inhibiteurs de kinases*

D'autres inhibiteurs existent mais n'ont pour l'instant pas d'AMM dans le traitement du MM. Il existe des inhibiteurs de la voie mTOR comme temsirolimus et everolimus. Temsirolimus a une AMM dans les carcinomes rénaux et le lymphome des cellules du manteau. Aux États-Unis, ce traitement est en cours d'essai dans le MM en association avec le BTZ dans les rechutes ou chez les patients réfractaires. Cette étude de phase I et II montre des résultats prometteurs avec une moindre survenue d'effets indésirables chez ces patients (58).

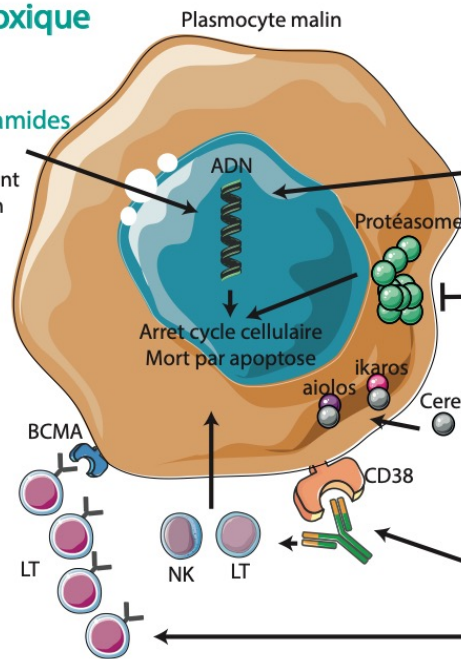
Un inhibiteur de kinases, sorafenib est en cours d'essai dans le MM en phase I/II aux États-Unis (NCT00536575, NCT00687674).

Un schéma récapitulatif des traitements est présenté dans la **Figure 1**

## Chimiothérapie cytotoxique et glucocorticoïdes

**ALKYLANTS** Cyclophosphamides  
**Melphalan**  
 Formation de pont intra et inter-brin avec l'ADN

**CORTICOIDES**  
**Dexaméthasone**  
**Prednisone**  
 anti-inflammatoire immunosuppresseur



## Thérapie ciblée

### INHIBITEURS D'HISTONE DESACETHYLASE

**Vorinostat**  
**Panobinostat**  
 Corrige la dérégulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'apoptose

### INHIBITEURS DU PROTEASOME

**Bortezomib**  
**Carfilzomib**

### IMiDs

**Thalidomide** Dégradation ikaros/aiolos  
**Lenalidomide** Cytotoxicité NK  
**Pomalidomide** Co-stimulation LT

### IMMUNOTHERAPIES

**Daratumumab**  
**Isatuximab**  
**Cellules CAR-T**

## Autogreffe

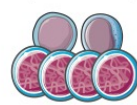
**1. Collecte**  
 Les cellules souches sont prélevées par cytophérèse



**2. Cryoconservation**  
 Le sang est congelé pour la conservation



**4. Ré-injection**  
 Les cellules souches décongelées sont ré-injectées au patient



**3. Aplasie**  
 Le patient reçoit une chimiothérapie à haute dose

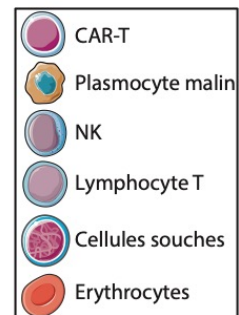


Figure 1: Les différents traitements du MM

## D. Les traitements symptomatiques et prophylactiques

Les patients reçoivent un traitement symptomatique des complications cliniques liées à la maladie, appelé traitement de support. Il contient des biphosphonates pendant les 6 premiers mois de traitement, ainsi que de l'érythropoïétine et des facteurs de croissance hématopoïétique granulocytaire humain (G-CSF). Les biphosphonates sont des inhibiteurs de l'activité ostéoclastique utiles dans le cadre du MM pour diminuer la lyse osseuse. On retrouve dans cette classe de médicaments, l'acide zolédronique (ZOMETA®) qui en plus d'inhiber la résorption osseuse a une activité cytostatique directe et pro-apoptotique(59). Le dénosumab est en cours d'essai mais n'apporte pour l'instant pas d'amélioration supérieure en comparaison à l'acide zolédronique, en termes de survie globale et de progression de la maladie(60).

Les traitements prophylactiques des effets indésirables médicamenteux sont adaptés selon le schéma thérapeutique choisit. En effet en cas de traitement à base de dexaméthasone, un traitement antibiotique est recommandé (amoxicilline et Bactrim Forte®) ainsi que des antiviraux (valaciclovir) avec la prise de bortezomib et des IMiDs. Pour la prophylaxie thromboembolique, de l'aspirine est instaurée (en cas de faibles comorbidités associées) ou encore des anti-vitamine K ou héparine de bas poids moléculaire (en cas de plusieurs facteurs de risques associés)(61).

## E. Le schéma thérapeutique

La prise en charge thérapeutique est définie en accord avec le patient en lien avec le médecin sur la base de l'avis rendu en réunion de concertation pluridisciplinaire. Le traitement du MM se déroule en 3 temps : l'induction, la consolidation et la maintenance. Seul le type de thérapies diffère en fonction de l'âge du patient et de l'inclusion ou non dans un protocole thérapeutique.

Chez un patient de moins de 65-70 ans on associe une chimiothérapie à une autogreffe alors que chez un patient plus âgé, l'autogreffe n'est pas possible (rapport bénéfice/risque insuffisant). Le choix du type de chimiothérapie sera également orienté selon le profil du patient.

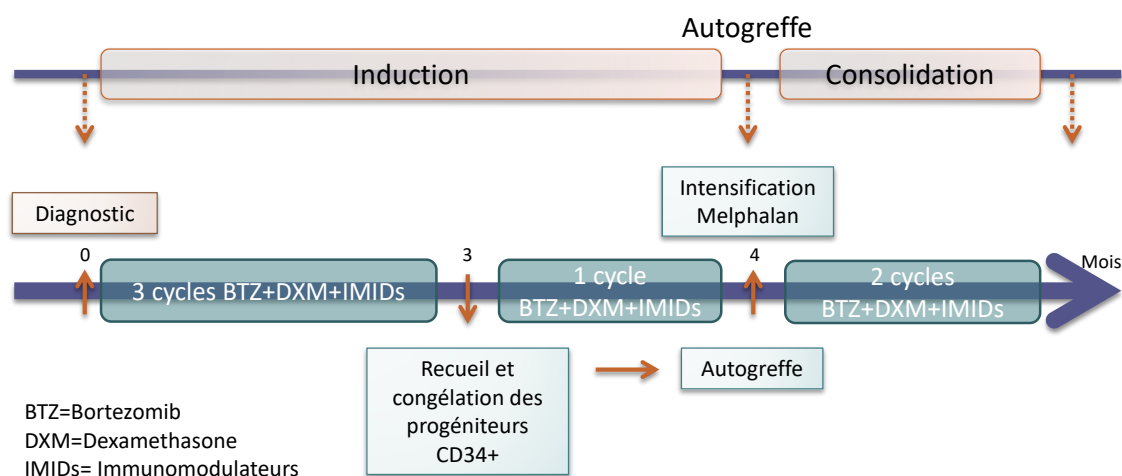
Le traitement classique d'un patient de moins de 65-70 ans, non inclus dans un protocole, comporte :

- Une chimiothérapie d'induction à base de BTZ + dexaméthasone + IMiDs (thalidomide ou revlimid) durant 4 cycles pour réduire au maximum la charge tumorale.
- Un prélèvement de cellules souches hématopoïétiques autologues est réalisé suite à une mobilisation de cellules CD34+ par des facteurs croissance quand cela est possible. Ces prélèvements sont réalisés après le 3<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie d'induction.
- Une intensification au melphalan suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- Un traitement de consolidation équivalent au traitement d'induction si ce dernier a donné des résultats probants.
- Un traitement de maintenance à base de lenalidomide, instauré dans le mois qui suit la consolidation, pendant 26 cycles (2ans).

Il est représenté en **Figure 2**.

Chez un patient de plus de 65-70 ans, hors protocole, on instaure seulement une chimiothérapie qui peut être :

- MP-THAL: Melphalan Prednisone Thalidomide. Schéma historiquement utilisé qui tend à disparaître.
- Ou MPV: Melphalan Prednisone Velcade® (bortezomib)(62).
- Ou REV-DEX : Revlimid® (lenalidomide) + dexaméthasone.
- Ou VEL-DEX : Velcade® (bortezomib) + dexaméthasone, pour les sujets les plus fragiles.(61)



**Figure 2:** Schéma thérapeutique "classique" du patient <65ans

## F. Évaluation de la réponse au traitement

### 1. Critères conventionnels

Le traitement du MM est en constante évolution et les patients répondent plus ou moins bien aux nouveaux essais cliniques qui se succèdent. L'International Myeloma Working Group (IMWG) a mis en place en 2006 des critères reproductibles d'évaluation de la réponse aux traitements(63):

- Des critères de réponse reposant sur la présence ou non de plasmocytes dans la moelle osseuse, d'Ig monoclonale urinaire et sanguine.
- Des critères de progression de la maladie basés sur les mêmes critères que ceux de la réponse, complétés par une analyse des lésions osseuses et de la calcémie.
- Des critères de rechute de la maladie avec une analyse complète identique à celle du diagnostic.

Ils sont référencés dans le **Tableau 2**.

Catégories	Sous-catégorie	Critères
Réponse au traitement	Rémission complète stringente (sCR)	Idem CR + - Ratio des chaînes légères libres normal - Immunophénotype plasmocytaire négatif
	Rémission complète (CR)	- Immunofixation sérique et urinaire négative - Disparition des plasmocytomes dans les tissus mous - ≤5% de plasmocytes médullaires
	Réponse partielle de bonne qualité (VGPR)	- Ig monoclonale détectable par immunofixation et non détectable en électrophorèse Ou - Ig monoclonale sérique diminuée de 90% et Ig urinaire <100mg/24h
	Réponse partielle (PR)	- Ig monoclonale sérique diminuée de 50% - Ig monoclonale urinaire diminuée de 90% ou <200mg/24h - Réduction de taille des plasmocytomes de plus de 50%
Progression de la maladie		- Augmentation de 25% par rapport à la valeur la plus basse pour : l'Ig monoclonale sérique ou l'Ig monoclonale urinaire ou le pourcentage d'infiltration plasmocytaire (>10%) - Lésions osseuse (nouvelle ou augmentation de taille) ou plasmocytome des tissus mous - Hypercalcémie (calcémie>11,5mg/dL ou 2,65mmol/L)
Rechute clinique		- Nouvelles lésions osseuses ou extra osseuses - ou Hypercalcémie (calcémie>11,5mg/dL ou 2,65mmol/L) - ou Diminution de l'hémoglobine ≥2g/dL - ou Augmentation de créatinine sérique ≥2mg/dL

**Tableau 2** - Critères d'évaluation de la réponse au traitement

## 2. La MRD

Grace aux nouvelles thérapies, on observe un taux élevé de réponse complète des patients. Il a donc été nécessaire de créer de nouveaux critères de réponses grâce à des analyses plus poussées des cellules tumorales résiduelles dans la moelle osseuse. Il s'agit de l'étude de la maladie résiduelle minimum (MRD) en utilisant des nouvelles technologies : la cytométrie en flux (CMF) ou encore le NGS. C'est dans cette optique que l'IMWG a défini des nouveaux critères de réponse de MRD négative (**Tableau 3**)(64). En 2008, Paiva *et al* publient des résultats de détection de MRD par CMF sur 295 patients. L'analyse de 125 patients MRD- *versus* 170 MRD+ révèle une meilleure PFS (respectivement 71 *versus* 37 mois), une meilleure survie globale (respectivement médiane non atteinte *versus* 89 mois) ainsi qu'une survie sur 5 ans de l'ordre de 60% *versus* 22% respectivement chez les MRD- *versus* MRD+(65). En 2018, Perrot *et al* confirment ces résultats par analyse des MRD de l'étude IFM2009 sur 700 patients au début de la maintenance et 12 mois post-greffe(66).

Catégories	Critères
MRD négative prolongée	MRD négative dans la moelle osseuse (par CMF et/ou NGS) et par imagerie. A confirmer sur un intervalle minimum d'1 an
MRD négative en CMF	Absence de clone phénotypiquement anormal dans la moelle osseuse par CMF (avec un minimum de sensibilité de $10^{-5}$ )
MRD négative en NGS	Absence de clone dans la moelle osseuse par NGS. Présence d'un clone= séquençage d'au moins 2 reads identiques en utilisant une plateforme avec une sensibilité $>10^{-5}$
MRD négative moelle et imagerie	MRD négative dans la moelle osseuse (par NGS et/ou CMF) + Disparition des hyper-métabolismes (visible au TEP-scan) ou diminution de la valeur d'absorption standardisée inférieure au médiastin ou diminution inférieure aux tissus mous environnants

**Tableau 3** - Critères de MRD

### III. Le microenvironnement du MM

L'introduction de nouvelles thérapies et de la greffe de cellules souches hématopoïétiques ont permis d'augmenter le taux de réponse et la survie globale des patients atteints de MM. Néanmoins cette pathologie reste incurable, et cibler l'environnement proche de la tumeur semble nécessaire. Les plasmocytes malins se développent dans la moelle osseuse grâce au support de l'environnement proche appelé microenvironnement. Il se divise en 2 compartiments :

- Un premier compartiment cellulaire composé de cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques (les lymphocytes, cellules myéloïdes, les NK, et ostéoclastes) et des cellules non hématopoïétiques dérivées de cellules stromales de la moelle osseuses (les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les vaisseaux sanguin).
- Un second compartiment non cellulaire composé de la matrice extracellulaire et d'un milieu rempli de cytokines, facteurs de croissances et chimiokines sécrétés par les cellules du premier compartiment.

Au début de la maladie cet environnement fonctionnel éradique la tumeur mais va ensuite agir en synergie avec les cellules tumorales pour créer un microenvironnement tumoral(67). Cet échappement de la tumeur au système immunitaire du sujet fait l'objet d'études et de développement de nouvelles thérapies, entre autres, *via* l'utilisation des immunomodulateurs. L'étude des cellules stromales de la moelle osseuse reste peu développée cliniquement et présente un enjeu important.

C'est dans cette optique que ce travail sur les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) a été réalisé.

## A. Caractéristiques principales des MSC

En 1974, Friedenstein est le premier à identifier des cellules stromales multipotentes provenant de la moelle osseuse et précurseurs de différentes lignées du tissu mésenchymateux(68,69). Ces cellules appelées cellules stromales mésenchymateuses sont décrites comme multipotentes, c'est à dire capables de se différencier en différents types cellulaires. Cette transdifférenciation *in vitro* pourra donner des cellules mésodermiques (adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes) mais aussi endodermiques (cellules musculaires, cellules pulmonaires) et ectodermiques (cellules épithéliales et neurones). Caplan AL les considère comme des cellules souches car elles ont, en plus de leur capacité de différenciation, la capacité de s'auto-renouveler(70). La communauté internationale scientifique considère ces cellules comme stromales (et non souches) car personne n'a réussi à prouver leur capacité d'autorenouvellement.

The International Society for Cellular Therapy propose en 2006 des critères requis pour définir une cellule comme MSC(71) :

- Leur adhérence au plastique,
- Un phénotype particulier avec l'expression à leur surface d'Ag spécifiques comme CD105, CD73 et CD90. La non-expression de marqueurs hématopoïétiques tels que CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 (ou CD19) et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR),
- Leur capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes.

Décrites au départ comme originaires de la moelle osseuse(70), elles ont été retrouvées depuis plusieurs années dans différents organes. Elles proviennent de tissus adultes comme le tissu adipeux(72) et le sang périphérique(73) mais aussi de tissus néonataux comme le sang de cordon ombilical, la membrane amniotique ou encore le placenta(74,75).

Leur localisation tissulaire affecte leur biologie, c'est pour cela qu'uniquement leur fonction décrite dans la moelle osseuse sera détaillée.

Outre leur capacité de régénération tissulaire par différenciation en différents types de tissus, leur rôle physiologique est double :

- Elles permettent de créer une niche pour les CSH, elles se différencient pour créer entre autres des ostéoblastes qui vont se positionner autour des cellules hématopoïétiques. Elles vont ensuite former une niche, ou du moins un cocon de



protection autour de ces cellules en les protégeant des signaux extérieurs de différenciation, d'activation et d'apoptose(76).

- Les MSC gardent cette niche dans un état quiescent grâce à leur activité antiproliférative. Pour bloquer la prolifération des HSC, la MSC peut se différencier en fibroblastes et chondrocytes et sécréter des facteurs comme de l'interféron gamma ( $IFN\gamma$ ) pour inhiber la prolifération des LT par exemple. De plus, les MSC ont aussi la capacité de moduler l'immunité innée et adaptative de leur environnement direct. Elles vont pouvoir agir sur différentes cellules immunitaires telles que les LT, les NK, les LB, les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques(77,78).

Les MSC jouent un double rôle dans l'inflammation. Selon le contexte elles peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. En présence d'un environnement inflammatoire, par exemple avec un taux élevé de  $TNF\alpha$  et d' $IFN\gamma$ , les MSC adoptent un phénotype plus immunosuppresseur via la sécrétion de facteurs qui suppriment la prolifération des LT (IDO, PGE2, NO,  $TGF\beta$  entre autres)(78) et inhibent les NK et les neutrophiles. Dans un contexte anti-inflammatoire, avec de faibles niveaux en  $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$ , les MSC vont sécréter des facteurs (MIP1 $\alpha$ , RANTES, CXCL9 et CXCL10) visant à améliorer la réponse des LT et recruter les lymphocytes sur le site de l'inflammation(78,79).

Elles ont aussi la capacité de polariser les macrophages vers un phénotype pro-tumoral par la sécrétion de cytokines (IL-8, IL-6, LIF, ...)(80). Par exemple dans le cancer ovarien, Le Naour *et al* ont montré que les MSC associées au cancer sont capables de polariser des monocytes sains vers un phénotype pro-tumoral via la sécrétion de cytokines (IL-8, IL-6, LIF, CXCL1/2, CCL5, CXCL3, 5 et 6). Inversement, *in vivo*, lorsqu'ils bloquent le récepteur (CXCR 1/2) à ces chimiokines, le phénotype des macrophages change pour devenir anti-tumoral(81). D'autres études, dont celle de Espagnolle *et al*, montrent que le contact direct entre macrophages anti-inflammatoires et MSC induit un phénotype particulier des MSC davantage immunosuppresseur(82). Toutes ces études démontrent que les MSC sont des cellules modulables, sensibles aux cellules et facteurs sécrétés dans le microenvironnement mais peuvent elles-mêmes modifier des cellules qui le composent, comme par exemple les macrophages.

De plus les MSC peuvent jouer un rôle anti apoptotique, protéger la tumeur et induire des résistances au traitement.

## B. Thérapies cellulaires utilisant des MSC

Les MSC ont une capacité de régénération tissulaire, un pouvoir immunosuppresseur et sont utilisées en thérapie cellulaire et médecine régénérative. A l'heure actuelle, environ 700 essais cliniques sont recensés pour l'utilisation des MSC dans les maladies inflammatoires et des lésions d'organes.

Dans les maladies orthopédiques, on les retrouve associées à des réparations de fractures osseuses(83), dans la reconstruction de l'os lors d'ostéonécroses(84), mais aussi dans la réparation du cartilage et l'ostéoarthrose. 844 greffes de MSC autologues ont été réalisées dans le traitement d'ostéoarthrite. Ces études réalisées à partir de MSC de patients mises en culture puis réinjectées au patient montrent leur efficacité, mais surtout un nombre faible d'effets indésirables(85). 15 patients atteints d'ostéoarthrites du genou ont reçu une injection allogénique intra-articulaire de 40 millions de MSC lors d'une étude clinique de phase I/II (NCT01586312). Cette intervention a permis d'éviter la chirurgie, une diminution de la douleur et d'augmenter significativement la qualité du cartilage(86).

Dans les thérapies cardiovasculaires, les MSC jouent un rôle dans la reconstruction des cellules cardiaques. L'injection intracardiaque de MSC chez 30 patients atteints d'ischémie myocardique a permis, dans l'étude POSEIDON, d'améliorer les conditions de vie des patients en améliorant le remodelage ventriculaire(87).

Les MSC sont aussi utilisées dans la réparation tissulaire lors des brûlures ou des plaies avec des programmes comme REBORNE et ADIPOA. Ces cellules ont la capacité de migrer jusqu'au tissu touché, se différencier et réguler la régénération tissulaire en produisant des facteurs de croissance, des cytokines et en inhibant les cellules du système immunitaire. Néanmoins, l'utilisation des MSC dans ce type de pathologies nécessite d'autres facteurs pour être efficace. Les limites de cette utilisation sont dues au nombre important de cellules à injecter, à l'origine des cellules (la cellule autologue évite le rejet), aux facteurs de croissance ainsi qu'au support physique biocompatible et adapté à la plaie(88).

Les MSC montrent aussi leur intérêt dans la sclérose en plaque, les lésions de la moelle épinière, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Une étude a été réalisée sur 12 patients qui ont reçu une transplantation de MSC bilatérale dans la zone subventriculaire cérébrale (2 millions de cellules par kilos du patient). Les 8 patients pris en charge au début de leur pathologie ont vu

des améliorations plus importantes (au niveau des signes cliniques) que les patients pris en charge plus tardivement, ainsi que l'arrêt de progression de leur maladie(89).

Actuellement les recherches se tournent vers leurs caractéristiques immunosuppressives dans les rejets de greffes. De nombreuses études ont décrit l'impact de l'utilisation des MSC dans les maladies auto-immunes (comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et la maladie de Crohn) mais aussi dans la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Dans un essai réalisé en 2009, 32 patients ont reçu 2 ou 8 millions de MSC/kg pour traiter le rejet de greffon contre l'hôte : 94% des patients ont répondu positivement au traitement sans différence significative entre les 2 doses de MSC injectées(90).

De rares études sur le MM ont montré que des MSC provenant de cordon ombilical ou de tissu adipeux peuvent avoir des effets bénéfiques en réduisant la charge tumorale sur des modèles *in vivo*(91).

Le potentiel thérapeutique des MSC s'est considérablement amélioré depuis leur découverte en 1960 et de nombreux essais thérapeutiques ont vu le jour, et ce grâce à leurs propriétés multipotentes, régénératrices et immunosuppressives. Cependant, leur utilisation dans le cancer reste en cours d'évaluation.

### C. MSC et cancer

Les MSC sont des cellules dites plastiques, elles ont la capacité de moduler leurs fonctions selon le type de tissus où elles se trouvent et selon l'environnement dans lequel elles sont. Elles sont présentes dans de nombreux tissus et sont connues pour migrer activement vers les sites de lésions tissulaires pour participer à leur réparation. Le cancer est considéré comme une « plaie qui ne guérit jamais » et nécessite donc un recrutement permanent de MSC. Lorsque la MSC se trouve au niveau du site tumoral, un dialogue bidirectionnel s'installe et conduit à un changement de phénotype de la MSC vers un phénotype pro-tumoral, on parle alors de CA-MSC pour MSC associée au cancer (ou encore TA-MSC pour MSC associée à la tumeur).

#### 1. MSC dans les maladies cancéreuses

Depuis ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées au rôle physiologique des MSC dans la carcinogenèse.

#### a) *Recrutement des MSC par la tumeur*

Lorsque la tumeur s'installe dans un tissu (solide ou hématologique) elle va recruter des cellules du microenvironnement dont les MSC. Shannon K *et al* ont injecté des MSC murines (exprimant la luciférase) à des souris porteuses de cancer du sein. Ils retrouvent après 12 jours une co-localisation de MSC luc+ avec les cellules tumorales(92). Guangwen R *et al*, ont reconstitué une moelle de souris irradiée à partir d'une injection intra-osseuse de MSC provenant de souris transgéniques où toutes les cellules expriment une protéine fluorescente verte (GFP). Suite à l'injection de cellules d'une lignée de lymphome (EL4), ils observent un recrutement important de MSC GFP+ (provenant de la moelle osseuse) au niveau du site tumoral(93). Les MSC se retrouvent guidées par la tumeur grâce aux facteurs sécrétés par cette dernière. En effet, il est maintenant établi depuis de nombreuses années que la tumeur sécrète des chimiokines et des facteurs de croissance pour recruter les cellules et créer son propre environnement. La sécrétion de chimiokines comme les CC-chimiokine Ligand 2 (CCL2), CCL5, CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12) et CXCL16, mais aussi des facteurs de croissance comme le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF1), les facteurs de croissance basiques fibroblastes (FGF-2), le VEGF, les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), les facteurs de croissance transformants- $\beta$  (TGF $\beta$ )(94) par la tumeur permet le recrutement des MSC. Les différents facteurs responsables du chimiotactisme des MSC dépendent du type de cancer et de la composition du microenvironnement tumoral.

#### b) *Communication Bidirectionnelle pour créer des CA-MS*

Au niveau du site tumoral, une communication s'établit entre les MSC et la tumeur permettant ainsi sa croissance, sa survie et la migration de cellules métastatiques par la suite vers d'autres organes. Une fois la MSC modifiée par la tumeur, on parle de CA-MS pour MSC associées au cancer.

Mandel *et al* montrent que la co-injection de MSC avec des cellules de cancer ovarien dans des souris immunodéficientes entraîne une augmentation de la croissance tumorale 10 fois plus importante et améliore leur capacité métastatique(95).

Dans les cancer ovariens, Castells *et al* montrent que les CA-MS favorisent l'angiogenèse permettant ainsi d'accélérer la croissance tumorale via notamment la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques, IL-6, IL-8 et VEGF, par les cellules tumorales mais aussi par les macrophages(80). Une revue de Kristin A et Charis Eng explique que les MSC sécrètent des

protéines morphogéniques osseuses (BMP) importantes pour la différenciation des cellules souches et pour la prolifération des cellules tumorales(96).

Dans la plupart des cancers on retrouve une inflammation importante au niveau du site tumoral organisée pour contrer la tumeur. Cette dernière va donc recruter des MSC pour réduire l'immunostimulation présente, notamment dans les cancers solides. Les CA-MSc sont capable de sécréter des facteurs qui vont polariser et modifier d'autres cellules présentes dans le microenvironnement, comme par exemple les macrophages. Dans un modèle murin de lymphome, les CA-MSc présentes au niveau du site tumoral expriment un niveau important de cytokines telle que l'IL-5, IL-6, CXCL1, CCL2, CCL7, CCL12 et VEGF. CCL2, CCL7 et CCL12 sont des chimiokines ligands de CCR2 exprimées à la surface des monocytes et des macrophages pro-tumoraux. Les MSC, via ces cytokines, vont chimio-attirer les monocytes et macrophages au niveau de la tumeur(93).

En résumé, un dialogue bidirectionnel s'installe entre la tumeur et les MSC via un contact direct cellule-cellule ou *via* la sécrétion de cytokines, d'autres facteurs de croissance ou encore d'exosomes. Cette interaction permet principalement de promouvoir la croissance tumorale via l'angiogenèse, l'immunosuppression mais surtout grâce au dialogue avec les autres cellules du microenvironnement.

## 2. MSC dans le MM

Dans le cadre du MM on retrouve un phénotype particulier de ces MSC qui a été décrit comme différent des MSC de donneurs sains et pourrait jouer un rôle dans le développement de la tumeur(97–100).

### a) *Origine et phénotype des MM MSC*

L'origine des MSC associées au Myélome (MM-MSc) n'est pas encore totalement établi. Les MSC étant des cellules très plastiques, elles pourraient soit devenir pro-tumorales suite à une éducation par les cellules tumorales et/ou le microenvironnement tumoral, soit être déjà pro-tumorales au départ et favoriser l'installation des plasmocytes malins.

Dans les premières études qui établissent le lien entre MSC et MM, Gunn *et al* montrent que des MSC saines produisent différentes cytokines dont l'IL6. Lorsque des lignées de MM sont mises en présence de sécrétomes de MSC saines, les cellules tumorales expriment fortement la Dickkopf-1 (DKK1) qui inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes(101). Il est donc

possible que l'environnement des MSC au départ soit propice au développement du plasmocyte. En 2014, Garcia-Gomez A *et al* ont analysé le profil transcriptomique des MSC (malades ou saines) en présence ou en absence d'une lignée plasmocytaire (MM1S). 2583 gènes sont retrouvés différentiellement exprimés entre des MSC en co-culture avec cette lignée et des MSC en monoculture, qu'elles proviennent de patients atteints de MM ou de donneurs sains. Dans cette liste de gènes on retrouve principalement des gènes surexprimés par la co-culture comme par exemple des chimiokines (CXCL1, CXCL5 et CXCL6). Ces chimiokines sont impliquées dans la prolifération des plasmocytes et la promotion de l'angiogenèse. D'autres gènes impliqués dans la prolifération des plasmocytes (CCL2, CCL3, CD44, EXT1, FN1, HAS2, HGF, IL1b, IL6, IL8, IL16), dans l'activation des ostéoclastes (CCL2, 3, 4, 20, CHSY1, IL1b, IL6, IL32, LIF) et dans l'inhibition des ostéoblastes (CCL3, EREG) sont retrouvés surexprimés par les MSC en présence de MM1S(102). Cette étude nous montre que les plasmocytes malins sont capables de modifier les MSC pour promouvoir leur croissance tumorale au sein de la moelle.

#### *b) Différence entre MM-MSc et HD-MSc*

Comprendre les mécanismes qui permettent d'expliquer la transformation phénotypique d'une MSC saine vers une MM-MSc et les modifications de sécrétomes associées permettraient de mieux comprendre et cibler les MSC dans le MM. Pour cela, différentes études ont analysé les différences qui existent entre des MSC dites saines (HD-MSc) et des MM-MSc.

En 2001, Wallace R est le premier à montrer une différence entre des MSC de MM et des MSC de donneurs sains : il parle alors de cellules progénitrices mésenchymales. Il analyse les cytokines sécrétées par des MSC de patients au diagnostic de la maladie. Il note que les MM-MSc expriment plus de cytokines IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  que les HD-MSc(97).

En 2007, un profil d'expression génique a permis de comparer le transcriptome de MSC saines à celui de MSC isolées de moelle de patients. Corre *et al* ont mis en évidence 145 gènes différentiellement exprimés entre MM-MSc et HD-MSc dont 94 sont retrouvés surexprimés par les MM-MSc. On retrouve une surexpression des facteurs de croissance déjà décrits comme impliqués dans le MM (IL1 $\beta$ , IL-6 et DDK1) mais aussi des nouveaux facteurs de croissance comme GDF15 qui augmentent la survie des plasmocytes malins (de lignées et de patients)(99,103).

Concernant les altérations génomiques des MM-MSC, Garayoa *et al* ont réalisé une hybridation génomique comparative (CGH array) sur 21 patients *versus* 12 donneurs sains. Quelques régions sont retrouvées altérées dans les MSC de MM mais ne sont pas en corrélation avec le pronostic du patient ou encore avec les altérations retrouvées dans les plasmocytes malins(104).

D'autres différences sont rapportées, notamment une augmentation de l'expression de gènes associés à la sénescence (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase), une augmentation de la capacité à supporter la croissance hématopoïétique (CD34+)(105) et une capacité immunosuppressive modifiée(106).

Toutes ces études nous prouvent que les MSC de MM sont génétiquement et fonctionnellement différentes des MSC saines probablement dans l'optique de favoriser la croissance tumorale.

### c) *Effet des MM-MSC dans le MM*

#### (1) *Expression de cytokines*

Les MM-MSC sont capables de promouvoir la croissance tumorale via différents mécanismes. La première est la sécrétion de facteurs de croissance et de chimiokines comme l'IL-10, TNF $\alpha$ , facteur de croissance hépatocytaire(HGF) (107) ou encore GDF15(103) et l'IL-6(101). En 2009, McNee a identifié un transcrite hautement up régulé chez les MM-MSC, PADI2 qui induit directement une augmentation de l'expression d'IL6 par les MM-MSC(108).

Dans la physiopathologie du MM, on retrouve une balance ostéoblastes/ostéoclastes dérégulée vers une augmentation en ostéoclastes qui induit des lésions osseuses. Comme décrit précédemment, les MM-MSC perdent cette capacité à se différencier en ostéoblastes(99,100) et sécrètent des cytokines qui vont favoriser le développement des ostéoclastes comme IL1 $\beta$ , IL6, IL17, CCL3, CCL4, facteur dérivé du stroma 1 (SDF1), TNF $\alpha$ ,...

#### (2) *Effet sur l'apoptose*

En 2010, Wang a montré que le contact direct de MSC avec des lignées de MM entraîne une surexpression de la survivine impliquée dans l'inhibition de la mort par apoptose des cellules tumorales(109). Ces résultats indiquent donc que les MSC supportent la croissance tumorale en inhibant la mort des plasmocytes médiée par la survivine.

### (3) Communication *via* des exosomes

Les MSC (HD ou MM) peuvent aussi communiquer avec les plasmocytes via des exosomes. Ces exosomes correspondent à de petites vésicules (de quelques nanomètres) qui sont produites par différents types de cellules et relâchées dans le milieu extracellulaire. Dans le cadre du MM, Roccaro *et al* montrent que des exosomes dérivés de MSC malades favorisent la prolifération de lignées plasmocytaires alors que celles provenant de MSC saines réduisent cette prolifération(110).

### (4) Expression des protéines de la matrice extracellulaire

Différentes études ont montré que les MM-MSC expriment plus de collagène IV, fibronectine et molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) que les HD-MSC(97,99). Les plasmocytes et les MSC dialoguent par contact direct grâce à des molécules de surface VCAM-1 pour les MSC et l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  very late antigen 4 (VLA-4) pour les cellules de MM. Cette interaction semble être impliquée dans l'inhibition de l'ostéoblastogenèse mais également dans le développement de la tumeur(111).

### (5) Immunomodulation et MSC

Dans un contexte inflammatoire, c'est-à-dire en présence de LT activés provenant de cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains, les MM-MSC perdent leur capacité d'immunosuppression(112). Li *et al* suggèrent une diminution de la capacité inhibitrice des MM-MSC. Les LT, en présence de MM-MSC, expriment des marqueurs d'activation tels que CD29 et CD69 contrairement à ceux présents avec des HD-MSC. De la même façon, la mort des LT par apoptose est plus importante en présence des HD-MSC. Leurs résultats suggèrent aussi que ces LT provenant de patients atteints de MM peuvent interagir avec des MSC saines et induire une diminution des facteurs de différenciation ostéoblastiques des MSC (phosphatase alcaline, RunX2 et ostéocalcine) (112). Giallongo *et al* s'intéressent à l'effet immunosuppresseur sur un autre type de cellules, les cellules suppressives dérivées de granulocytes myéloïdes (G-MDSC). Dans leur cas, seules les G-MDSC qui ont été éduquées avec des MM-MSC sont capables de bloquer la prolifération des LT. L'effet immunosuppresseur pourrait provenir de l'éducation de la MM-MSC(106).



# ETUDE DES MSC DE PATIENTS DANS LA RECHUTE DU MM

## I. Contexte de l'étude

### A. Intérêt de l'étude

Comme décrit précédemment, les MSC semblent être continuellement recrutées pour devenir un compartiment à part du microenvironnement tumoral. Elles vont jouer un rôle dans l'initiation et la promotion des plasmocytes malins et influencer le reste du microenvironnement tumoral. Leur impact sur la progression de la maladie suite au traitement et/ou dans la rechute soulève encore de nombreuses questions. Pour répondre à cette question, nous avons procédé ainsi :

- Dans un premier temps, nous avons défini des critères pour organiser une cohorte de patients atteints de MM la plus homogène et représentative possible. Dans ces critères, on retrouve un choix en termes de types de traitements reçus et en termes de type de patients (en rechute ou non).
- Dans un deuxième temps, les cellules ont été mises en culture comme décrit dans la littérature(71) et récupérées 21 jours plus tard pour réaliser une étude transcriptomique.
- Enfin, une analyse bioinformatique de ce transcriptome a été réalisée pour mettre en évidence des modifications des voies de signalisation au cours du traitement des patients.

Ces analyses nous ont permis de mettre en lumière des différences d'expressions géniques entre des MSC issues de différents patients (des patients au moment du diagnostic et des patients en fin de traitement) mais aussi de noter une différence d'expression entre des MSC venant de patients atteint de MM ou de donneurs sains. Des analyses biologiques sont nécessaires pour déterminer l'impact de l'activation des voies de signalisation découvertes dans cette analyse, dans l'influence des MSC dans la progression tumorale.

## B. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de l'étude était de comparer le génotype et le phénotype des MSC de patients dits en rémission suite au traitement face à des MSC de patients prélevées au moment de la rechute afin d'identifier une implication potentielle des MSC dans la rechute.

Dans le cas où une différence pouvait être notée, l'objectif secondaire de cette étude était de d'identifier les voies de signalisation activées par les gènes différenciellement exprimés et évaluer leur influence dans la progression de la maladie (mécanistique et mise en évidence de biomarqueurs de récidence).

## II. Matériel et méthodes

### A. Sélection des données

Cette étude a été réalisée sur des prélèvements de moelle osseuse de patients reçus à l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole (IUCT-O). Toutes les données sont issues de patients pour lesquels un prélèvement de moelle osseuse a été réalisé et envoyé à l'unité onco-génomique du Myélome (UGM) de Toulouse en vue de diagnostiquer une possible rechute après le traitement.

Nos échantillons proviennent d'une banque de prélèvements de moelle osseuse congelés a été réalisée au laboratoire depuis plusieurs années et mise à disposition, ainsi que des prélèvements quotidiens reçus tous les jours au laboratoire.

Une analyse rétrospective des dossiers de l'ensemble des patients enregistrés à Toulouse et présents dans la banque a été réalisée en utilisant le Dossier Patient Informatisé (DPI) présent sur l'interface informatique du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Toulouse. Les données recueillies pour chaque patient sont :

- Nom, prénom, date de naissance, sexe
- Date de prélèvement de moelle
- Type de prélèvements : diagnostique/post greffe et date en mois après la greffe
- Type de protocole de chimiothérapie reçue au diagnostic de la maladie
- Patient éligible ou non à l'autogreffe et si oui, la date de greffe
- Type de consolidation reçue avec la date de début
- Rechute s'il y a lieu, avec la date de rechute biologique

- Analyses biologiques d'Ig sérique et urinaire et myélogramme

Une cohorte homogène a donc été créée sur la base de patients ayant reçu une chimiothérapie d'induction de 3 à 5 cycles de VTD, puis une autogreffe suivie ou non d'une consolidation. Les patients ont été regroupés en 4 groupes : les diagnostiques (D avec n=12), les rechutes précoces (ER avec n=9), les Rémissions (R avec n=10) et les donneurs sains (HD avec n=10). Les **Tableaux 5 et 6** regroupe les caractéristiques des patients et des moelles osseuses prélevées.

Ces prélèvements de patients sont obtenus conformément aux dispositions de la loi n°94-549 du 1<sup>er</sup> juillet 1994, référé dans le dossier n°16.500Ter du projet « Patients atteints de Myélomes Multiples : Recherche d'une association entre modification moléculaire/immunologique et survie des patients ».

Ces résultats ont été comparés à une banque de moelle osseuse de donneurs sains. Il s'agit de prélèvements de moelle osseuse achetés à l'étranger.

## B. Méthodes d'intervention

### 1. Culture cellulaire

Les moelles osseuses sont reçues à l'UGM où les plasmocytes sont triés par billes magnétiques CD138 sur un autoMACS Pro separator (miltenyi Biotec®). Il en ressort une fraction positive (F+), contenant les plasmocytes malins, utilisée pour l'analyse cytogénétique et une fraction négative (F-) utilisée pour l'analyse du microenvironnement. Cette F- est centrifugée puis subit une lyse des globules rouges pour en ressortir les cellules mononuclées de la moelle. Ces cellules sont ensuiteensemencées dans des flasques en plastique à une concentration de 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> avec du milieu de culture nommé MEM $\alpha$  contenant du Minimum Essential Media  $\alpha$  supplémenté en Sérum de Veau Fœtal non décomplémenté (10%) et de la ciprofloxacine (0,5%). Les MSC sont ainsi sélectionnées par leur capacité à adhérer au plastique. Le milieu complet est changé 2 fois par semaine pendant 21 jours. A l'issue de cette culture, les MSC sont décollées avec de la trypsine + Éthylènediaminetétraacétique puis comptées pour être congelées dans 350 $\mu$ L d'un Buffer de lyse (composé de guanidine-thiocyanate avec 0,1% de  $\beta$ mercaptoethanol).

## 2. La cytométrie en flux (CMF)

Une partie des cellules lysées est marquée grâce à des Ac couplés à un fluorochrome. Ces Ac reconnaissent spécifiquement des récepteurs présents à la surface des MSC. Les Ac utilisés sont référencés dans le tableau ci-dessous :

Laser	Chanel	Longueur d'onde d'émission	Antigène	Dilution	Clone	Références
UV	BUV395	379/28	CD14	1/100	MØP9	BD Biosciences 563561
Violet	BV421	421	CD138	1/200	MI15	BD Biosciences 562935
	BV510	510	CD45	1/100	HI30	BD Biosciences 563204
	BV711	710/50	CD20	1/100	MRC-OX-104	BD Biosciences 743086
Blue	FITC	519	Viability	1/1000		Ozyme BLE423112
	PerCpCy5.5	695	CD90	1/100	5E10	BD Biosciences 561557
Yellow/Green	PE	578	CD105	1/100	SN6	eBioscience 12-1057-42
Red	APC	660	CD73	1/100	AD2	BD Biosciences 560847
	APCcy7	785	CD11b	1/100	ICRF44	BD Biosciences 557754

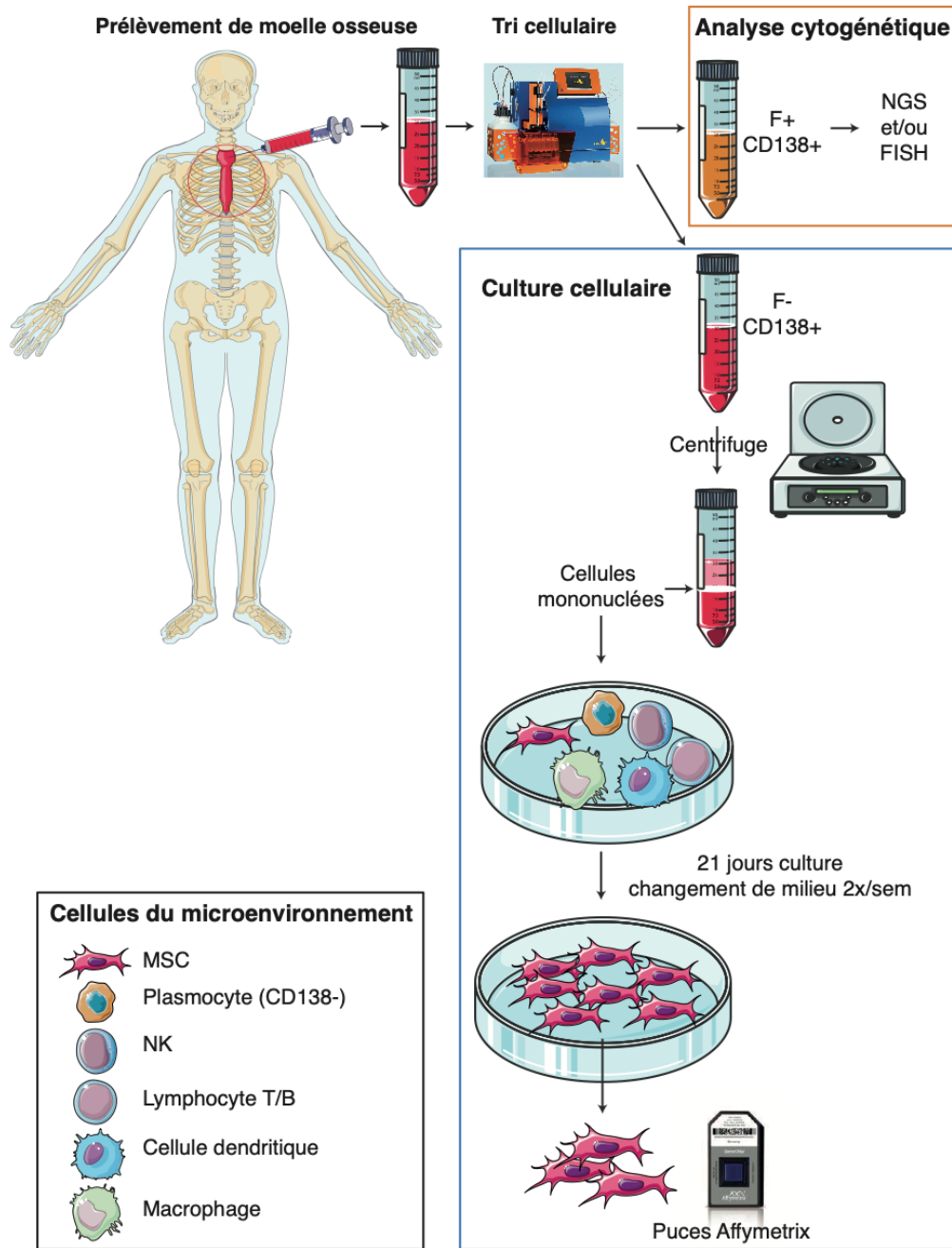
**Tableau 4:** Références des Ac utilisés en CMF

Les Ac présentés ci-dessus sont préparés ensemble à différentes dilutions notées dans le **Tableau 4** dans une solution appelée tampon FACS. Ce tampon FACS contient du tampon phosphate salin appelé PBS associé à 15% de Sérum de Veau Fœtal et 2,5mL d'Éthylènediaminetétraacétique (0,5M). 50µL de ce mélange d'Ac est utilisé pour marquer environ 10 000 MSC pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Le marquage est ensuite lavé avec du FACS Buffer puis centrifugé 5 minutes à 1500 rotations par minute. Chaque type de MSC est repris dans 200µL de FACS buffer et analysé sur un cytomètre FORTESSA X20. Un contrôle pour chaque Ac d'intérêt est réalisé et se nomme Fluorescence moins 1 (FMO). Il correspond au mélange d'Ac sans l'Ac d'intérêt. Par exemple pour la FMO de CD90, il y a dans le mélange les Ac ciblant CD11b, CD14, CD138, CD45, CD20, CD73, CD105 et viability. Cette FMO permet de connaître le « négatif » de l'Ac d'intérêt, ici de CD90, avec tous les autres fluorochromes qui peuvent perturber la fluorescence de ce dernier.

## 3. Extraction ARN

L'ARN des différents prélèvements de MSC est ensuite extrait grâce au RNeasy Micro Kit (Qiagen, ID : 74004). Brièvement, les cellules sont lysées, homogénéisées puis passées sur une membrane de silice qui retient l'ARN (Acide RiboNucléique), les contaminants extérieurs sont nettoyés par lavage et l'ADN génomique est digéré par de la désoxyribonucléase I (Qiagen,

ID : 15200-50). L'ARN est ensuite élué dans 30µL d'eau puis quantifié par Nanodrop 2000 et son intégrité est vérifiée sur un Agilent 2100 Bioanalyzer.

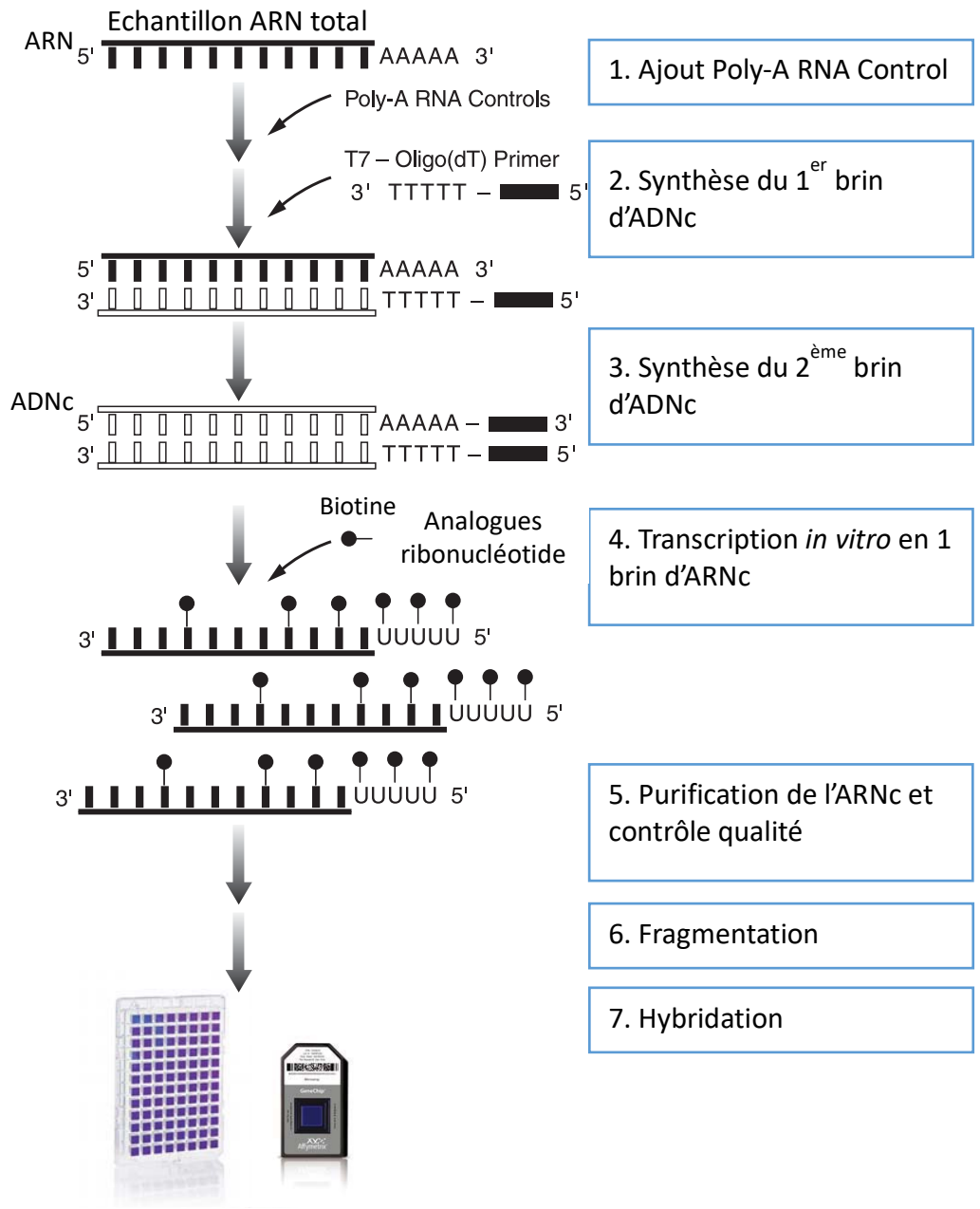


**Figure 3:** Schématisation de l'isolation des MSC à l'analyse transcriptomique

La moelle osseuse est prélevée au niveau du sternum du patient puis triée avec des billes magnétiques CD138. La fraction positive (F+) est utilisée pour l'analyse cytogénétique pronostique et la fraction négative (F-) pour la recherche sur le microenvironnement tumoral. Cette F- est centrifugée pour en récupérer les cellules mononucléées qui sontensemencées sur flaque. Après 21 jours de culture, les cellules sont décollées par de la trypsine. Le transcriptome est analysé sur des puces Affymetrix.

#### 4. Puces affymetrix

L'analyse transcriptomique est réalisée sur des puces à ADN Affymetrix (GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit). 100ng d'ARN total est mis en présence d'une queue poly-A RNA control puis une reverse transcription primée par un oligodT est réalisée sur thermocycler (Veriti Thermal Cycler Applied Biosystems) pour synthétiser un premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) simple brin. Sur le même thermocycler, on utilise ensuite un mélange à base d'RNase H qui va dégrader l'ARN, et d'ADN polymérase qui va synthétiser le second brin d'ADNc et va servir de matrice pour la transcription. Par la suite, l'ARN polymérase T7 est utilisée pour synthétiser et amplifier l'ARN complémentaire par transcription *in vitro* de la matrice d'ADNc du second brin. Ce brin d'ARNc est purifié pour éliminer les enzymes, les sels, les phosphates inorganiques et les nucléotides non incorporés pour être ultérieurement fragmenté. Pour cette étape de fragmentation, l'ARNc purifié est fragmenté par des cations divalents à 94°C. Finalement cet ARN fragmenté est hybridé sur des puces 20X Hybridation (Thermofisher 902162). Les étapes clefs de notre protocole d'étude (une fois l'extraction des ARN réalisée) sont détaillées dans la figure ci-dessous.



**Figure 4:** Synthèse de l'hybridation sur puces Affymetrix

## C. Méthodes d'analyse

Les données générées selon les groupes prédéfinis auparavant (cf II.A) ont été converties en données informatiques pour en sortir des expressions de gènes. Ces données ont ensuite été filtrées et normalisées sous R avec différents packages :

- `affy` : permet de traduire des intensités en données brutes d'expression, filtre les données, normalise via la méthode Robust Multiship Average (RMA) et crée une matrice d'expression de gènes par analyse d'expression différentielle
- `biomaRt` : traduit les numéros de sondes en nom de gènes en utilisant la base de données Ensembl
- `gplots` : permet de visualiser ces données sur des heatmaps
- `FactoMineR` : permet de visualiser ces données sur des analyses en composantes principales (PCA)

Une analyse d'expression différentielle a été réalisée pour permettre la comparaison des différents groupes. Des heatmaps ou « carte de chaleur » ont ensuite été générées. Elles correspondent à une représentation analytique utilisée pour visualiser des données, ici pour visualiser les différences d'expression de gènes entre plusieurs groupes. De plus, une PCA a permis une analyse factorielle et la visualisation des corrélations entre les différentes MSC. La PCA correspond à une méthode d'analyse statistique multivariée qui permet de transformer des variables liées entre elles en nouvelles variables, dites en « composantes principales », non liées les unes aux autres. Dans cette analyse, les données d'expression géniques sont regroupées en différentes variables permettant ainsi de passer de nombreuses variables (X gènes exprimés) en une nouvelle variable (groupements de gènes exprimés de la même façon dans un même groupe de MSC). Elle maximise la variation entre les groupes c'est à dire qu'elle prend ce qui est identique et ce qui est différent pour regrouper les groupes entre eux.

Les données sont représentées lorsque les différences sont significatives avec une p valeur ajustée  $<0,05$  et un fold change d'expression (FC) compris entre 0,5 et 2. C'est-à-dire que les données utilisées pour cette analyse comprennent des expressions de gènes sur ou sous exprimés d'un groupe par rapport à un autre plus de 2 fois.

Les listes de gènes qui en ressortent sont analysés grâce au logiciel en ligne Panther.



### III. Résultats

#### A. Choix de la cohorte

Le MM est une maladie extrêmement hétérogène sur le type de traitement, l'âge de survenue et le type de rechute. Il a donc fallu, pour cette étude, sélectionner des critères d'inclusions des patients pour réaliser une cohorte la plus homogène possible en termes de type de traitement, d'âge et date de survenue de la rechute. Les données sont regroupées dans le **Tableau 5**.

	Numéro Anonymisation	Femme ou Homme	Age de découverte (années)	Type traitement	Moment du prélèvement (mois post greffe)	
Rechute précoce	ER1	H	64	4VTD/greffe/2VTD	14	
	ER2	H	56	3VTD/greffe/2VTD	9	
	ER3	F	65	4VTD/greffe/2VTD	23	
	ER4	H	42	4VTD/greffe/2VTD	18	
	ER5	F	54	4VTD/greffe/NR	24	
	ER6	F	50	4VTD/greffe/2VTD	12	
	ER7	F	61	4VTD/greffe/2VTD	12	
	ER8	F	59	VTD/greffe/NR	15	
	ER9	F	64	4VTD/greffe/VTD	19	
					Rechute : Non (depuis années) Oui (Date années)	
Rémission	R1	H	54	VTD/greffe/NR	13	Oui (5ans)
	R2	F	65	4VTD/greffe/NR	22	Non (6ans)
	R3	F	62	VTD/greffe/NR	5	Non (5ans)
	R4	F	52	4VTD/greffe/VTD	6	Non (5ans)
	R5	F	65	4VTD/greffe/NR	24	Oui (4ans)
	R6	H	67	VTD/greffe/NR	14	Non (6ans)
	R7	F	64	4VTD/greffe/VTD	12	Non (5ans)
	R8	F	63	4VTD/greffe/NR	21	Non (4ans)
	R9	F	59	5VTD/greffe/2VTD	8	Non (5ans)
	R10	H	56	4VTD/greffe/NR	24	Non (4ans)

**Tableau 5** : Caractéristiques des patients inclus

L'âge, le sexe, le type de traitement, la rechute ou non pour les patients en rémission ainsi que la date de prélèvement en mois post greffe sont renseignés dans ce tableau. Le chiffre avant le type de cycle renseigne le nombre de cycles reçus, lorsqu'il n'est pas présent c'est que les données du patient n'étaient pas disponibles. De la même façon, le type de consolidation n'est pas toujours disponible. (ER : Rechute précoce ; R : Rémission ; VTD : Velcade, Thalidomide, Dexaméthasone ; NR : Non Renseigné ; ttt : traitement)

L'âge moyen de diagnostic de la maladie dans chacun des groupes est de  $57 \pm 7$  ans et  $60 \pm 5$  ans chez les patients en rechutes et les patients en rémission respectivement. Ils ont tous reçu une induction avec au moins 3 cycles de VTD puis une autogreffe. On retrouve 67% et 70% de femmes chez les patients en rechute et ceux en rémission respectivement. Notre cohorte est donc homogène en termes d'âge, de sexe des patients et du type de traitement reçu.

Dans un premier temps nous avons voulu comparer le transcriptome des MSC prélevées sur un même patient tout au long de son traitement (diagnostic, post-greffe et rechute) c'est-à-dire des prélèvements de patients dit appariés. Malheureusement cette analyse n'a pas pu être réalisée compte tenu du nombre important de prélèvements non exploitables issus de la banque (trop peu de cellules après remise en culture) et il a été difficile de trouver des patients homogènes en termes de traitements. Nous avons donc décidé de comparer des patients dit « non appariés » c'est-à-dire différent entre diagnostic et post greffe.

Ainsi, nous avons sélectionné des prélèvements de moelle osseuse de patients et nous les avons séparés en différents groupes :

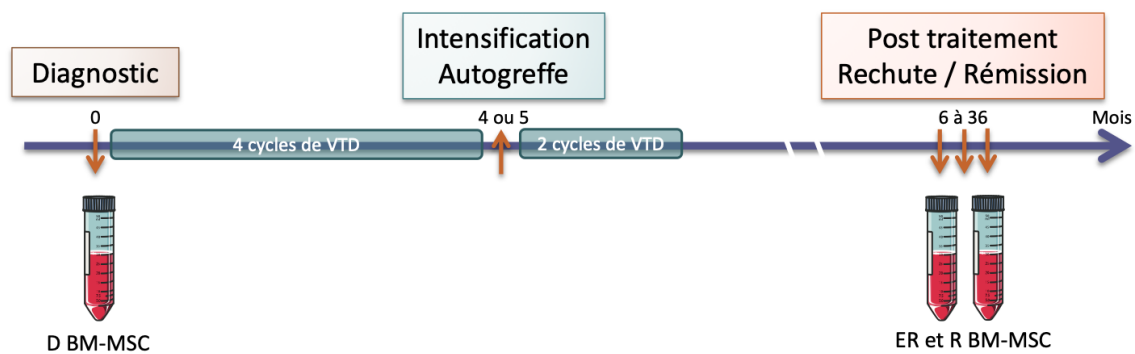
- Des patients prélevés au diagnostic du MM ou D (n=12). Ce groupe joue le rôle de contrôle et permet de comparer nos analyses avec celles déjà publiées(99). Les patients sont prélevés au diagnostic de la maladie, avant tout traitement ;
- Des patients prélevés lors de leur rechute (groupe « rechute précoce » ou ER) (n=9). Dans ce groupe on retrouve des prélèvements de patients récupérés au moment de la rechute biologique définit dans le **Tableau 2** par la « progression de la maladie » (cf II.F.1). Ils sont appelés « rechute précoce » car ils sont récupérés entre 5 mois et 2,5 ans post greffe ;
- Des patients en rémission lors du prélèvement (3 ans minimum post-greffe). Ce groupe est appelé « en rémission » ou R (n=10). Pour ce groupe, les patients sont dits en rémission s'ils n'ont pas rechuté dans les 3 ans post greffe. Pour le suivi des patients, nous ne pouvons en général pas aller au-delà de 6 ans car les premiers prélèvements ont été congelés en 2012 et les plus exploitables en termes de cellules remontent à 2013/2014 ;
- Des prélèvements de donneurs sains ou HD (n=10). Ce groupe est constitué de moelles osseuses de donneurs sains achetées à l'étranger. En effet, dans les études publiées qui comparent des MSC de MM avec des MSC de prélèvements de moelles saines sont souvent issus de prothèses totales de hanche (PTH) et donc de prélèvements de fémur.

Or dans le MM, le prélèvement de moelle est réalisé au niveau du sternum. De nombreuses études montrent que les MSC sont différentes selon leur origine(73–75), c'est donc pour cela que nous avons utilisé des moelles saines provenant de prélèvements réalisés au niveau du sternum. De plus les donneurs sont normalement exempts de pathologies contrairement aux prélèvements de PTH qui sont souvent très inflammatoires.

	Numéro Anonymisation	Femme ou Homme	Age	Type moelle
<b>Sain</b>	HD1	H	32	Sain
	HD2	H	20	Sain
	HD3	F	27	Sain
	HD4	F	34	Sain
	HD5	H	33	Sain
	HD6	H	24	Sain
	HD7	H	28	Sain
	HD8	F	24	Sain
	HD9	F	27	Sain
	HD10	H	23	Sain
<b>Diagnostique</b>	D1	F	50	Diagnostique
	D2	F	54	Diagnostique
	D3	H	42	Diagnostique
	D4	H	54	Diagnostique
	D5	F	57	Diagnostique
	D6	H	50	Diagnostique
	D7	H	37	Diagnostique
	D8	F	50	Diagnostique
	D9	H	48	Diagnostique
	D10	H	59	Diagnostique
	D11	H	52	Diagnostique
	D12	H	59	Diagnostique

**Tableau 6:** Caractéristiques des donneurs sains et des patients au diagnostic

L'âge moyen de diagnostic de la maladie est de  $51 \pm 6,5$  ans et  $27 \pm 4$  ans chez les donneurs sains. Les patients au diagnostic de la maladie ont une moyenne d'âge homogène à la cohorte de rechute et de rémission alors que la moyenne d'âge des donneurs sains est plus faible. Ce biais est pris en compte dans les analyses. Notre cohorte est donc le plus homogène possible en termes d'âge et de sexe des patients.



**Figure 5:** Schématisation du recueil des prélèvements de patients

Le type de thérapie reçue est schématisé dans cette figure. Les moelles osseuses sont prélevées sur des patients au diagnostic (D BM-MSC), à la rechute précoce (ER BM-MSC) et en rémission (R BM-MSC).

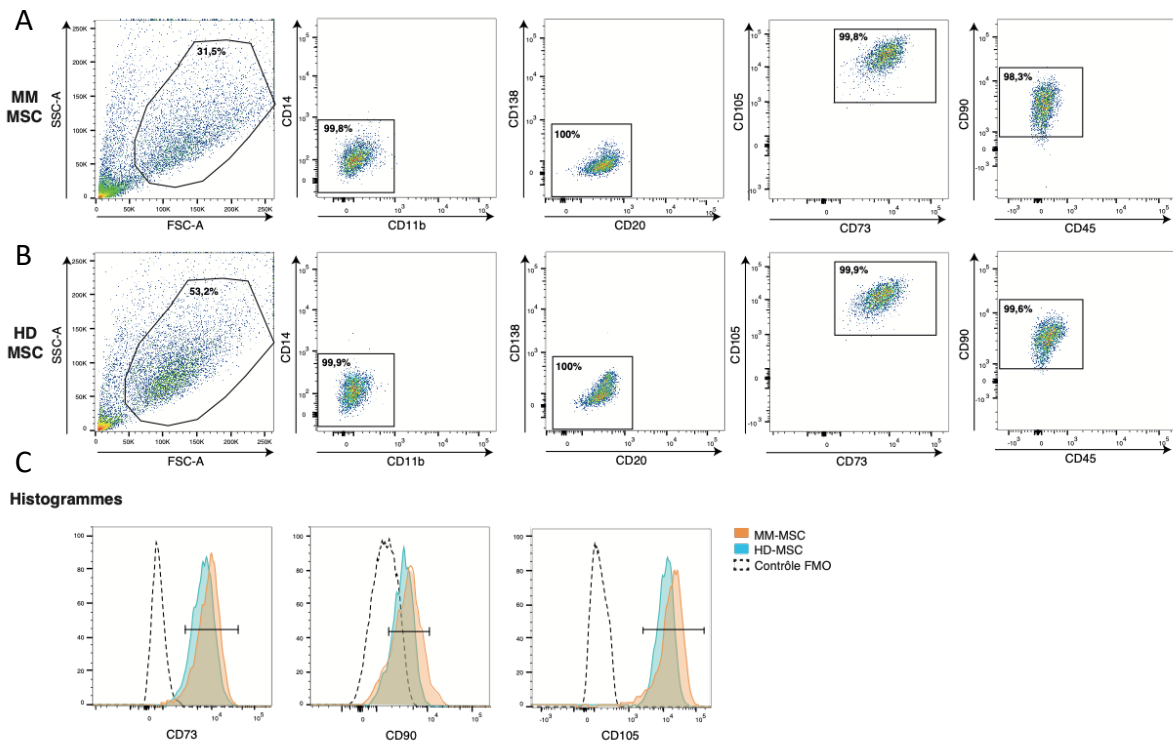
## B. Isolement et phénotypage des MSC de patients

### 1. Isolement des MSC à partir de moelle osseuse de patient

Une fois la cohorte créée, il a fallu isoler les MSC de la moelle des patients. Comme décrit dans II. Matériel et méthodes, nous recevons à l'UGM des moelles osseuses de patients qui sont triées, en fraction positive (F+), par leur marqueur de plasmocytes malins : le CD138. Le reste de la moelle contenant le microenvironnement tumoral, aussi appelée fraction négative (F-), est, quant à elle, utilisée pour la recherche au laboratoire. Dans ce microenvironnement on retrouve entre autre des MSC, des lymphocytes, des monocytes, des cellules dendritiques, des NK, des érythrocytes mais aussi quelques cellules tumorales qui expriment faiblement leur CD138(113). Pour éliminer les hématies, une lyse érythrocytaire est réalisée avant la mise en culture des autres cellules dans des flasques en plastique. Les MSC vont adhérer au plastique et se mettre à proliférer. Les autres cellules du microenvironnement ainsi que les cellules tumorales restantes sont éliminées dès le premier lavage car non adhérentes au plastique. Seuls les monocytes-macrophages ont aussi cette capacité d'adhésion. A 10 jours d'ensemencement, les MSC sont décollées avec de la trypsine car elles forment des unités formants des colonies (CFU) et sont ré-étalées sur une même flasque. Les monocytes-macrophages sont connus pour être résistants à la trypsine et sont donc rapidement éliminés.

## 2. Phénotypes des MSC obtenues

Pour confirmer le phénotype des MSC isolées sur flasques, une analyse des marqueurs de surface a été réalisée. Par cytométrie en flux (CMF) on observe un amas homogène de cellules de taille importante, positives pour les marqueurs spécifiques des MSC : CD90, CD73, CD105 et négatives pour des marqueurs hématopoïétiques (CD45), plasmocytaires (CD138), des LB (CD20) et des monocytes-macrophages (CD14, CD11b) (**Figure 6**).



**Figure 6:** Expression des marqueurs de surface des MSC

L'analyse des MSC par CMF révèle que les cellules présentes en culture sont négatives pour les marqueurs CD14, CD11b, CD138, CD20 et CD45 et positives pour les CD73, CD90 et CD105 aussi bien sur les prélèvements de moelle osseuse de patients (A) que de donneurs sains (B). Les marqueurs positifs CD73, CD90 et CD105 sont présentés (C) par rapport au contrôle FMO.

Ainsi, nous avons pu montrer que nos conditions de prélèvements de moelle osseuse et de culture cellulaire nous permettaient d'obtenir des cultures homogènes de MSC. Cette condition essentielle étant vérifiée, nous avons entrepris de déterminer leur rôle dans la rechute du patient atteint de MM.

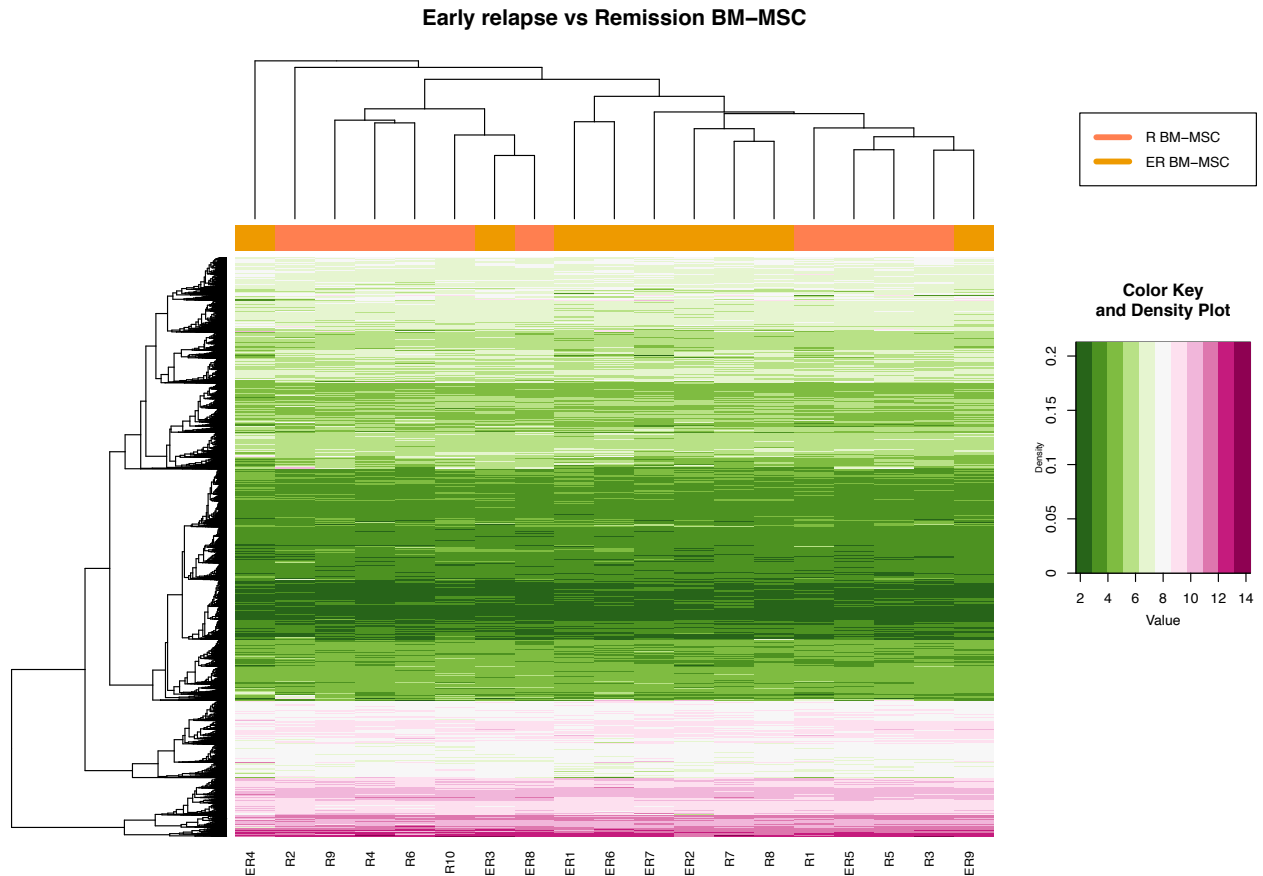
## C. Analyses transcriptomiques

Afin d'étudier le rôle des MSC dans la rechute au traitement, nous avons ensuite extrait l'ARN des MSC des différents groupes après 21 jours de culture comme décrit dans II. Matériel et méthodes. Nous avons ensuite transcrit de façon inverse ces ARNs en ADNc qui ont été finalement transcrits, fragmentés et hybridés sur des puces Affymetrix. Un résumé du protocole établi est schématisé dans la **Figure 3** du II. Matériel et méthodes.

### 1. Comparaison des différents groupes

#### a) *Rechute versus Rémission*

Les données obtenues, suite au passage des puces, ont été filtrées et normalisées pour obtenir des expressions de gènes dans chacun des groupes. Ces listes d'expression de gènes ont ensuite été comparées entre les groupes pour identifier des différences d'expression. En effet, notre question principale était de comprendre si les MSC peuvent jouer un rôle dans la rechute du patient. Pour cela nous avons comparé, suite à la greffe autologue, l'expression de gènes de MSC isolées de patients qui sont en train de rechuter à celle de gènes de MSC de patients qui sont encore loin de leur rechute. La représentation par heatmap est exposée dans la figure ci-dessous.



**Figure 7:** Heatmap BM-MSc Rechute versus Rémission

Représentation graphique des taux d'expression en gradient de couleur allant de la sous expression (en vert) à la surexpression (en rose) entre des MSC de patients en rechute versus en rémission. En ligne, on retrouve les gènes (liées aux sondes) et en colonne, les différentes MSC de patients. Les ER BM-MSc correspondent aux rechutes et les R BM-MSc aux rémissions. Il n'y a pas de différence significative d'expression génique entre les 2 groupes.

Les MSC de patients en rechute et celles de patients en rémission ne montrent pas de différence significative en terme d'expression génique. On s'aperçoit donc que suite au traitement le phénotype des MSC ne permet pas de prédire la rechute mais montre que, lorsque la pathologie s'installe, elle induit une modification phénotypique et génotypique des MSC. Cette modification est durable, indépendamment du stade de la maladie.

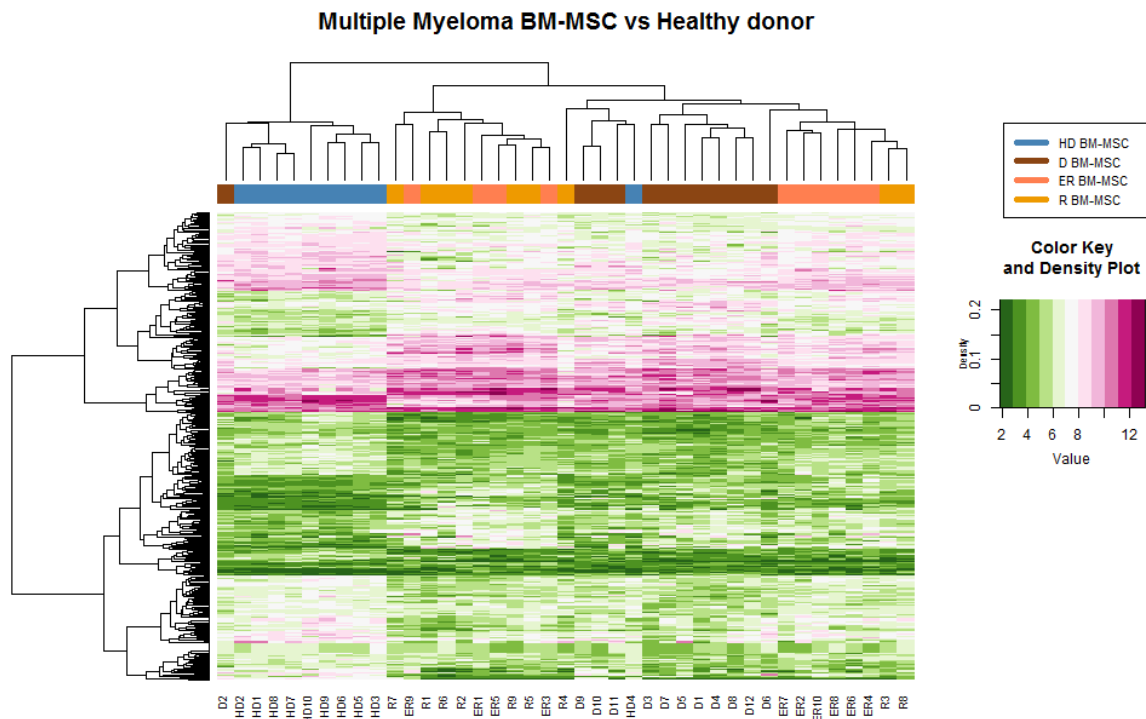
Les MSC, cellules multipotentes, sont capables de se différencier en ostéoblastes. Dans le MM on retrouve une balance déséquilibrée avec beaucoup d'ostéoclastes et peu d'ostéoblastes, présents aussi bien au diagnostic qu'après la greffe. Il est possible que la différence observée induise une perte de capacité des MM MSC à se différencier en ostéoblastes que ce soit au diagnostic de la maladie(100,114) mais également pendant tout le suivi du patient. Cette hypothèse devra être vérifiée.

Il est donc intéressant d'analyser les gènes exprimés par ces MM MSC dans un premier temps par rapport à des MSC saines pour savoir si les gènes différentiellement exprimés chez les MSC au cours du développement de la pathologie sont impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Si ces résultats s'avèrent positifs, ils devront être confirmés par l'analyse des signes cliniques et savoir si les patients en rémission et en rechute continuent de présenter des lacunes osseuses.

#### *b) Donneurs sains versus MM*

Au vu de des résultats précédents, nous avons ensuite comparé les transcriptomes des MSC provenant de patients post traitement avec le transcriptome de MSC isolées à partir de donneurs sains. L'objectif de cette analyse est de déterminer si les MSC issus de patients ayant été traités ont un phénotype proche de celui des MSC de sujets sains ou au contraire un phénotype identique à celui de MSC issues de patients nouvellement diagnostiquées pour un MM. Les résultats de différence d'expression sont donnés dans les figures ci-dessous.

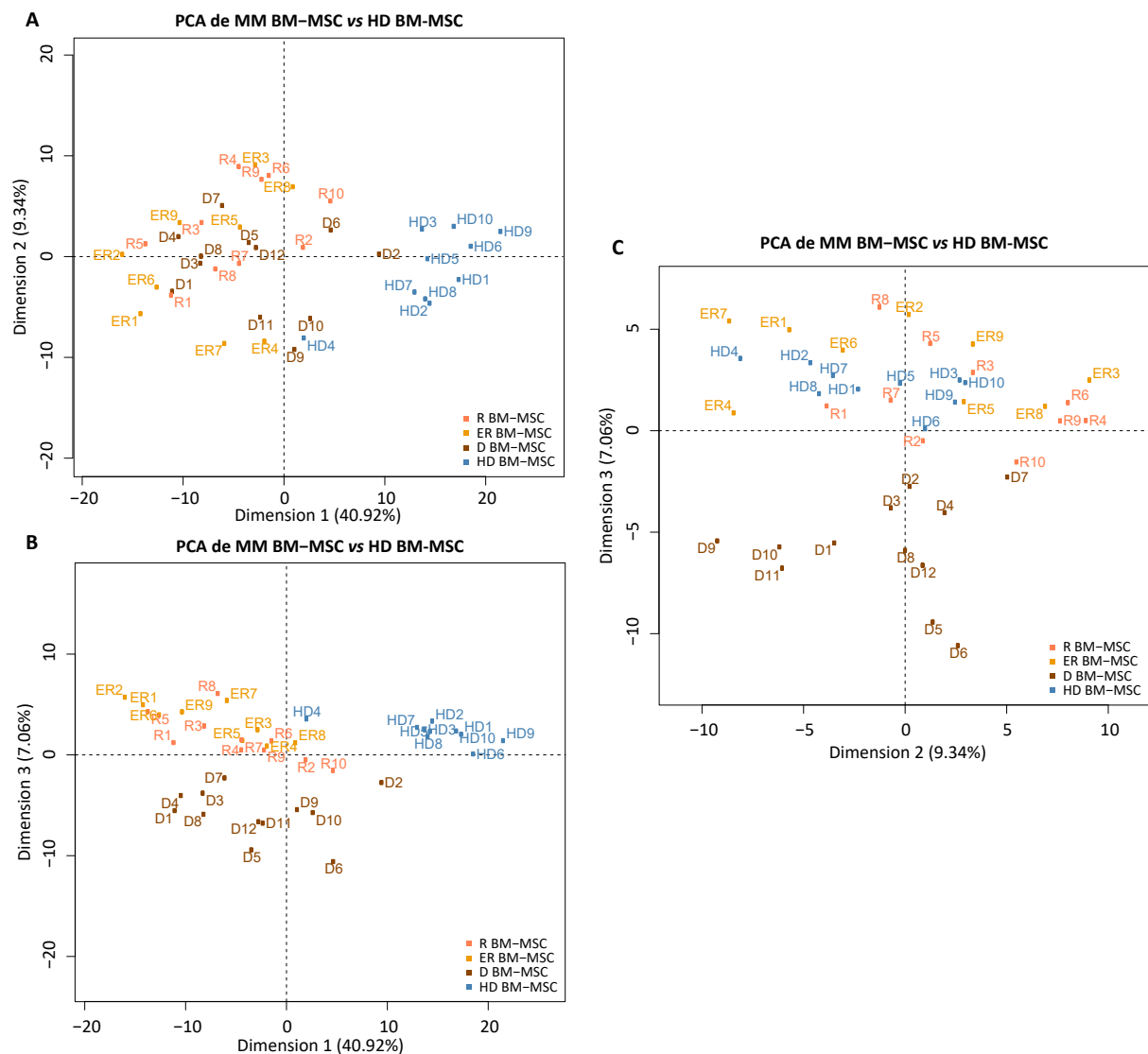




**Figure 8:** Heatmap des MSC de MM versus donneur sain.

Représentation graphique des taux d'expression en gradient de couleur allant de la sous expression (en vert) à la surexpression (en rose) entre des MSC de patients (à différents stades) versus des donneurs sains. En ligne, on retrouve les gènes (liées aux sondes) et en colonne, les MSC des différents groupes. Les HD BM-MSC correspondent aux cellules issues de donneurs sains, les D BM-MSC correspondent aux cellules issues de patients au diagnostic, les ER BM-MSC correspondent aux cellules issues de patients prélevés au moment de la rechutes et les R BM-MSC correspondent aux cellules issues de patients en rémission au moment du prélèvement. Pour cette analyse la p valeur ajustée est inférieure à 0,05.

Entre des MSC de donneurs sains et des MSC de MM (tous stades confondus), on observe 2747 gènes différentiellement exprimés dont 440 ont une p valeur ajustée <0,05. Ces résultats sont confirmés par l'analyse PCA présentée ci-dessous.



**Figure 9:** PCA des MSC de patients atteints de MM versus donneurs sains

3 dimensions retrouvées dans ce panel de groupes sont représentées, les dimensions 1 et 2 (A) ; les dimensions 1 et 3 (B) et les dimensions 2 et 3 (C). Chacune correspond à une liste de gènes différemment exprimés entre nos groupes (sain versus malade) qui permet de séparer les groupes entre eux. 40% des gènes expliquent l'axe 1, 9% l'axe 2 et 7% l'axe 3. De la même façon, les HD BM-MSC correspondent aux donneurs sains, les D BM-MSC aux patients au moment du diagnostic, les ER BM-MSC aux patients au moment de la rechute et les R BM-MSC aux patients en rémission au moment du prélèvement. Pour cette analyse la p valeur ajustée est inférieure à 0,05 et le FC est inférieur à 0,5 et supérieur à 2.

Ces PCA nous permettent de visualiser et différencier 3 groupes : les MSC issues de donneurs sains, les MSC issues de patients au diagnostic et les MSC issues de patients ayant été traité pour un MM. En effet :

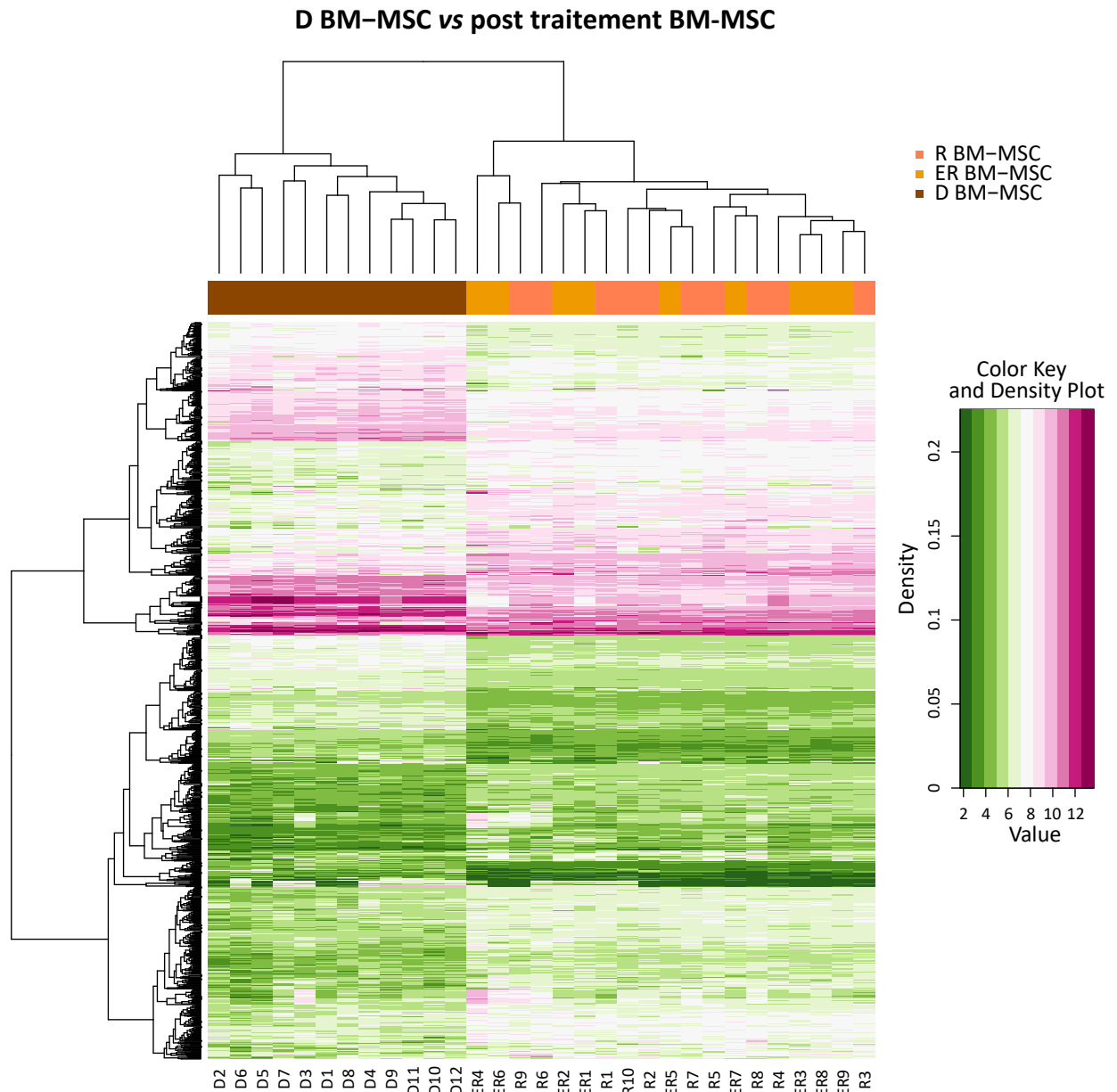
- La première dimension, correspond à une liste de gènes dont l'expression permet de séparer les MSC de donneurs sains avec celles de patients atteints de MM. On a dans ce cas 40% des gènes qui expliquent cet axe 1, c'est-à-dire que, sur la liste de gènes différenciellement exprimés entre les groupes, 40% permettent de créer cette dimension.
- La seconde dimension ne permet pas de séparer les groupes.
- La troisième dimension sépare les groupes correspondant aux patients au moment du diagnostic et ceux à l'issue de leur traitement. Ici on a 7% des gènes qui expliquent cet axe 3.

On retrouve environ 57% de gènes qui permettent de différencier les groupes.

On s'aperçoit dans ces analyses que les MSC de patients atteints de MM ont une véritable signature qui les différencie d'un donneur sain. Il reste malgré tout à comprendre ce que la MSC devient au cours du traitement. En effet, en réalisant une PCA sur ces différents groupes on distingue une dimension qui permet de différencier les MSC issues de patients prélevés au diagnostic de celles issues de patients prélevés post traitement. Il semblerait donc que les MSC acquièrent un phénotype différent des MSC présentes au moment du diagnostic sans toutefois revenir à un phénotype correspondant à des MSC issues d'un donneur sans antécédent histoire de MM (donneurs sains).

### *c) Diagnostic versus post traitement*

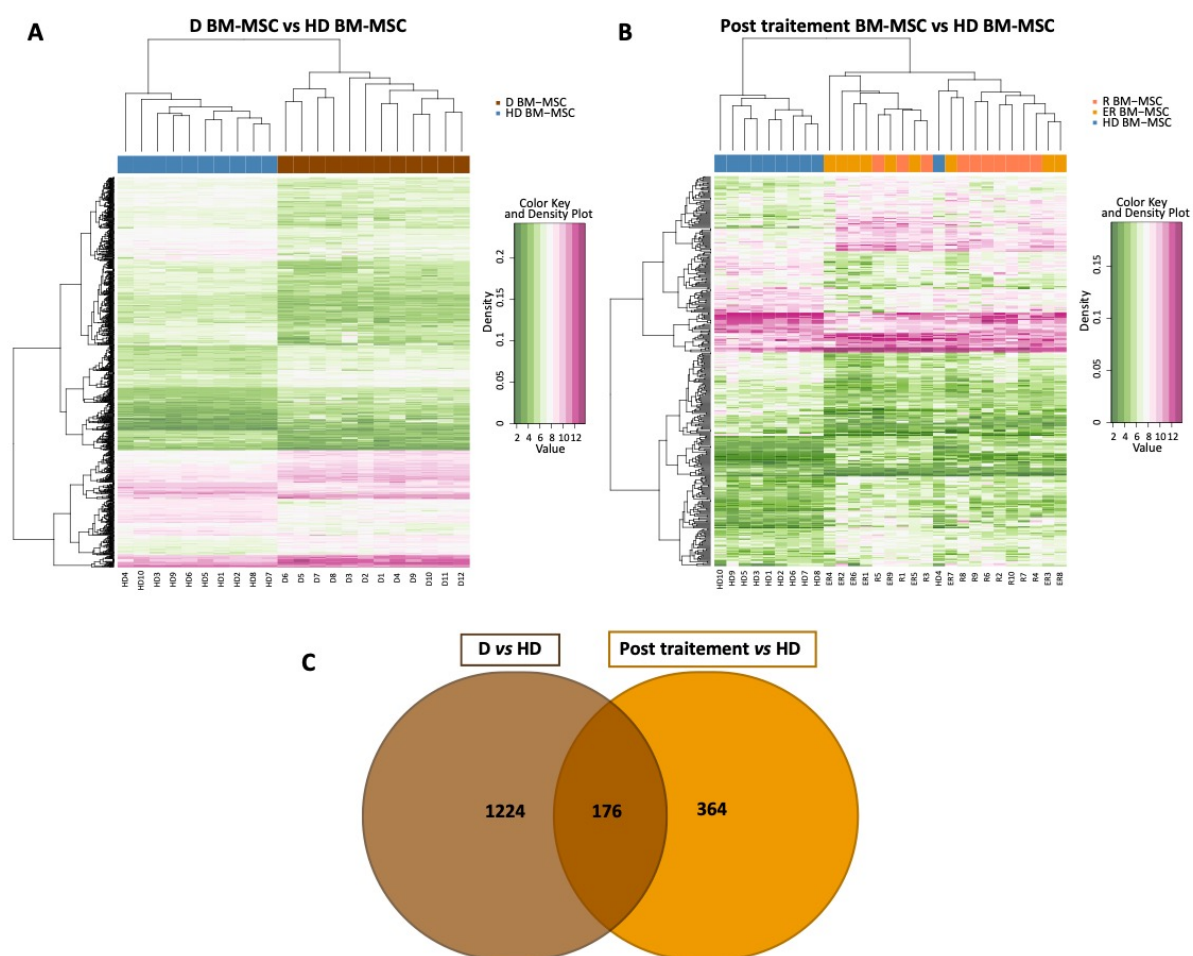
Pour mieux comprendre l'impact du traitement sur le phénotype de la MSC, nous avons regroupé les MSC de rechutes et de rémission en un seul groupe appelé post traitement et comparé ce dernier à des MSC issues de patients prélevés au moment du diagnostic. Les résultats sont regroupés dans la heatmap suivante (**Figure 10**).



**Figure 10:** Heatmap des MSC de diagnostic versus post traitement

Représentation graphique des taux d'expression en gradient de couleur allant de la sous expression (en vert) à la surexpression (en rose) entre des MSC au diagnostic versus post traitement. En ligne, on retrouve les gènes (liées aux sondes) et en colonne, les MSC des différents groupes. De la même façon, les D BM-MSc correspondent aux patients prélevés au moment du diagnostic, les ER BM-MSc aux patients au moment de la rechute et les R BM-MSc aux patients en rémission au moment du prélèvement. Pour cette analyse la  $p$  valeur ajustée est inférieure à 0,05 et le FC est inférieur à 0,5 et supérieur à 2.

On peut observer ici 2700 gènes différentiellement exprimés. 892 d'entre eux ont une expression significativement différente entre les 2 groupes (p valeur ajustée <0,05). Cette Heatmap nous indique que les MSC prélevées sur des patients en post traitement présentent un phénotype différent des MSC prélevées sur des patients au moment du diagnostic. Nous nous sommes ensuite intéressés aux gènes qui ont une expression significativement différente entre dans les MSC issues de patients atteints de MM et celles issues de donneurs sains et qui reste significativement différente tout au long du traitement et de la récurrence. En effet, ces gènes pourraient nous indiquer si les MSC jouent un rôle dans la persistance et la rechute de la pathologie. Pour cela 2 heatmaps ont été créés.



**Figure 11:** Heatmap des MSC de diagnostic versus sain et de post traitement versus sain  
 Représentation graphique des taux d'expression en gradient de couleur allant de la sous expression (en vert) à la surexpression (en rose) entre des MSC au diagnostic versus des donneurs sains (A) et des MSC post traitement versus des donneurs sains (B). En ligne, on retrouve les gènes (liées aux sondes) et en colonne, les MSC des différents groupes. De la même façon, les HD BM-MSc correspondent aux donneurs sains, les D BM-MSc aux patients au

*moment du diagnostic, les ER BM-MSc aux patients au moment de la rechute et les R BM-MSc aux patients en rémission au moment du prélèvement. Pour cette analyse la p valeur ajustée est inférieure à 0,05 et le FC est inférieur à 0,5 et supérieur à 2. Représentation des gènes différentiellement exprimés communs entre ces groupes (C).*

On retrouve 1400 gènes différentiellement exprimés entre les MSC issues de prélèvements de patients au moment du diagnostic et des MSC issues de donneurs sains. 540 gènes sont différentiellement exprimés par des MSC issues de prélèvements de patients post traitements par rapport aux MSC issues de donneurs sains (p valeur ajustée <0,05) dans les 2 listes. Seulement 176 gènes sont communs entre ces 2 groupes c'est-à-dire dont l'expression différentielle persiste du diagnostic à la récurrence ou lors du maintien de la rémission. Finalement très peu de gènes sont retrouvés différentiellement exprimés entre les MSC issues de patients et celles issues de donneurs sains. Afin d'identifier un potentiel rôle des MSC dans le maintien de la pathologie, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation activées par les expressions différentielles de 176 gènes identifiés précédemment.

## 2. Analyse des voies de signalisation impliquées

Suite aux analyses d'expression de gènes *via* les heatmaps, plusieurs listes de gènes différentiellement exprimés entre 2 groupes ressortent significatives. Leur étude est nécessaire pour une meilleure compréhension de l'impact des MSC dans le MM. Pour cela une analyse *via* le logiciel Panther est réalisée. Ces résultats sont présentés sous forme de voies de signalisation impliquées dans les expressions de gènes d'un groupe par rapport à un autre.

Liste communs					
Voie de signalisation	Nom de gène	MM versus HD		D versus HD	
		FC	Expression	FC	Expression
Ostéogénèse	1 DKK	5,741	5,741	2,390	2,390
	RUNX2	0,496	-2,017	0,471	-2,122
	PDGFRL	0,352	-2,840	0,381	-2,626
	ITGA2	2,820	2,820	2,443	2,443
	WNT2B	0,535	-1,869	0,440	-2,275
Wnt signaling	PCDH10	4,805	4,805	3,396	3,396
	EDN1	5,031	5,031	1,776	1,776
	CDH6	2,561	2,561	2,275	2,275
	MYH3	0,454	-2,203	0,501	-1,996
	TLE2	0,389	-2,571	0,496	-2,016
	CCND1	1,841	1,841	1,814	1,814
Coagulation sanguine	F2R	4,879	4,879	7,515	7,515
	F2RL2	7,487	7,487	4,336	4,336
	PLAT	4,418	4,418	2,478	2,478
	SERPINB2	31,817	31,817	15,317	15,317
	SERPINE1	2,229	2,229	1,904	1,904
	TFPI	2,862	2,862	3,124	3,124
Integrine	COL12A1	0,388	-2,580	0,297	-3,367
	ITGA2	2,820	2,820	2,443	2,443
	ITGA11	0,571	-1,752	0,606	-1,649
	NTN4	1,877	1,877	2,254	2,254

**Tableau 7:** Liste des gènes communs aux MSC de MM retrouvés différentiellement exprimés par rapport aux MSC de donneurs sains.

Les voies de signalisation analysées par le logiciel Panther sont représentées dans ce tableau. Elles comprennent plus de 4 gènes différentiellement exprimés avec un fold change (FC) et une quantité d'expression en nombre de fois sur (+) ou sous (-) exprimées de MM-MSC par rapport aux HD-MSC.

L'analyse des différences d'expression de gènes qui restent communs tout au long du traitement du patient fait ressortir 4 voies de signalisation :

- La voie de signalisation impliquée dans l'ostéoblastogenèse, avec une sous-expression par les MM-MSC de RUNX2, PDGFRL, WNT2B et une surexpression de DDK1 et ITGA2.
- La voie de signalisation de Wnt, avec une surexpression de PCDH10, EDN1, CDH6 et CCND1 et une sous-expression de WNT2B, MYH3 et TLE2 par les MM-MSC.
- La voie de signalisation de la coagulation sanguine est fortement surexprimée et met en jeu les gènes F2R, F2RL, PLAT, SERPINB2, TFPI.
- La voie de signalisation impliquant les intégrines, avec une surexpression de ITGA2 et NTN4 et une sous-expression de ITGA11 et COL12A1 par les MM-MSC.

Ces résultats nous amènent à penser que la MSC garde un phénotype malin même après l'autogreffe.



## CONCLUSION ET DISCUSSION

Les MSC présentent des différences de phénotype par rapport à des MSC issues de donneurs sains lorsqu'elles sont associées à des cellules tumorales dans un ensemble de cancer solides ou hématologiques(99). L'ensemble de la littérature et nos résultats montrent que la présence de plasmocytes malins est associée à un changement de phénotype de la MSC. Les MSC pourraient être impliquées dans la croissance des plasmocytes via différentes voies : en sécrétant directement des facteurs de croissance(105) ; en modifiant ses capacités immunosuppressives(106,112) ; en inhibant la mort par apoptose des plasmocytes *via* des facteurs sécrétés(109) et en sécrétant des exosomes(110). Les nombreuses cytokines et facteurs de croissance qu'elles sécrètent sont également capables d'agir sur les autres cellules composant le reste du microenvironnement(99–101,103,107,108). Les MSC sont capables d'exprimer des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans l'inhibition de la différenciation ostéoblastique(111). Toutes ces études ont analysé l'impact de la présence des MSC dans le développement du MM. Toutefois, peu de données permettent de différencier l'impact de la présence d'une MSC de moelle osseuse saine *versus* l'impact d'une MSC phénotypiquement différente. Nous avons donc mis en place un modèle d'étude des MSC pour essayer de comprendre comment leur variation phénotypique, induite par le développement de la pathologie (activation des MSC), pourrait avoir un impact dans la rechute du patient.

Nos travaux ont été réalisés sur une cohorte de patients homogènes en termes d'âge, de types de traitements et de types de prélèvements. Nous avons dans un premier temps, comparé le transcriptome de MSC issues de patients traités par autogreffe de CSH et prélevés soit au moment de la **rechute** soit pendant la période de **rémission**. L'analyse transcriptomique ne nous permet pas de différencier les MSC issues de ces 2 types de patients par l'expression de leur ARN. Bien que ces analyses mériteraient d'être confirmées par une analyse protéomique des MSC issues de patients à différents temps post traitements, nous pouvons quand même suggérer que les MSC subissent une modification de leur transcriptome lors de l'apparition d'un MM. Cette modification est pérenne post traitement, les MSC ne retrouvant pas leur phénotype originel (donneurs sains).

Par ailleurs, si on analyse le profil des patients atteints de MM, on se rends compte que chaque patient rechute à plus ou moins long terme. Ne pouvant mettre en évidence un marqueur phénotypique des MSC capable de prédire la rechute des patients, nous avons voulu identifier par quelle voie les MSC pouvaient influencer sur le développement du MM. Nous avons pour cela comparé le profil transcriptomique des MSC issues de patients ayant eu un antécédent de MM. De façon surprenante, lorsque l'on compare des MSC de **donneurs sains** à des MSC provenant de **patients à différents stades du MM** (diagnostic et post traitement), on discerne 3 groupes distincts : les MSC de donneurs sains, les MSC dites de « diagnostic » et les MSC dites « post traitement ». Nous avons confirmé que les 2 groupes **diagnostic** et **post traitement** étaient bien différents phénotypiquement par une analyse qui retrouve 892 gènes différentiellement exprimés entre ces 2 groupes. Les MSC suite au traitement semblent donc bien différentes des MSC de diagnostic mais ne retrouvent pour autant pas leur phénotype de MSC saines ce qui pourrait appuyer le fait que le patient rechute toujours, même après l'autogreffe.

Ainsi nous avons comparé les expressions de gènes qui restent différentiellement exprimés au **diagnostic** et **post traitement** par rapport à l'expression de MSC de **donneurs sains**. On retrouve une liste de 176 gènes communs avec 4 voies de signalisation principalement impliquées : les voies de différenciation ostéoblastique et la voie Wnt/ $\beta$ cathénine ; les voies de la coagulation sanguine et les voies impliquant la matrice extracellulaire avec les intégrines. Les voies de différenciation des MSC sont régulées par différents facteurs. De nombreuses études montrent l'impact de DKK1 et de la voie Wnt sur la différenciation des MSC en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes(114–116). DKK1 est une protéine antagoniste de la voie Wnt/ $\beta$ cathénine impliquée dans de nombreux métabolismes dont fait partie la différenciation des MSC. La voie Wnt est connue pour jouer un rôle dans l'embryogenèse. Le dérèglement de cette voie est impliqué dans de nombreux cancers. De plus cette voie est corrélée au métabolisme osseux et adipocytaire dans la différenciation des MSC.

En effets de nombreuses études montrent l'impact négatif de DKK1 dans la différenciation ostéoblastique(114–117). De plus, on le retrouve impliqué dans le MM à travers quelques études qui montrent une corrélation entre une élévation du taux important de DKK1 et la présence de lésions osseuses chez les patients atteints de MM. Les plasmocytes malins sécrètent une forte quantité de DKK1 qui entrainerait une diminution de la différenciation des

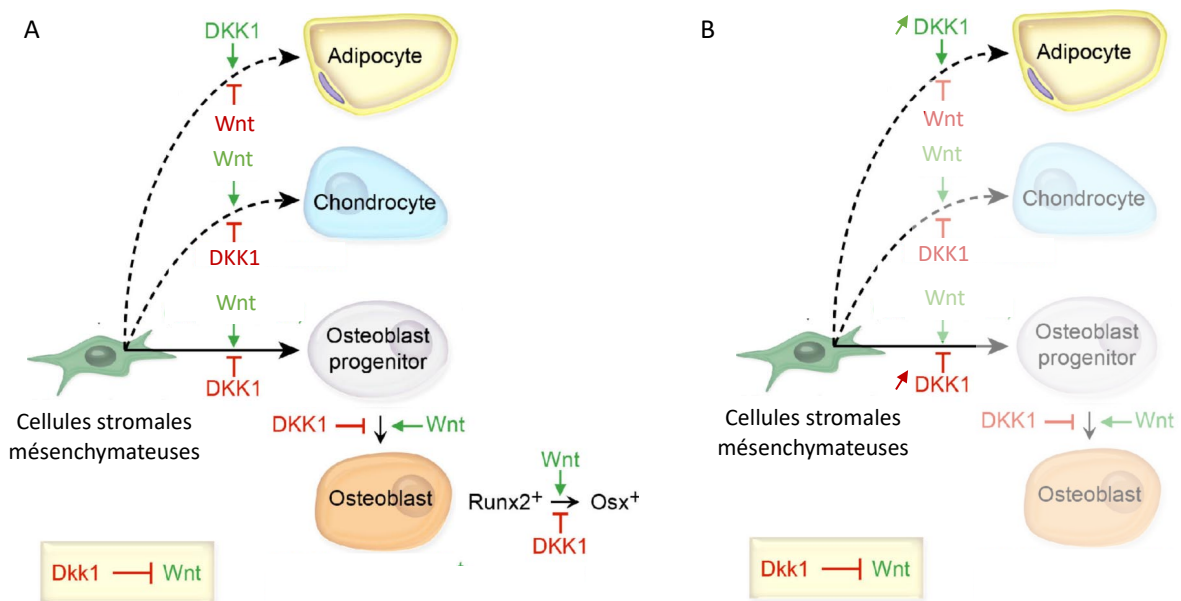
MSC en ostéoblastes(114,116). Pinzone *et al* montrent que DKK1 sécrété par les plasmocytes malins va inhiber la différenciation des MSC en ostéoblastes et favoriser l'activation des ostéoclastes(117).

De plus DKK1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire. DKK1 sécrété par les préadipocytes pourrait favoriser l'abiogenèse et être corrélé avec une diminution de la voie de signalisation Wnt(118).

Si on ajoute à ces données de la littérature une surexpression de DKK1 par les MSC visible ici dans le transcriptome, on comprend pourquoi des fragilités osseuses persistent même après l'autogreffe des patients atteints de MM.

De plus, on retrouve dans cette analyse, une sous expression de RUNX2 par les MSC de MM. Ce phénomène est concordant avec ce qui est connu dans la littérature : l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ catheine sur les MSC entraîne une diminution de l'expression de RUNX2 qui bloque l'ostéogénèse (119).

Ces résultats sont synthétisés par la figure suivante adaptée de la revue de Pinzone *et al* :



**Figure 12:** Impact de DKK1 et Wnt sur la différenciation des MSC

La figure A présente ce qui se passe chez un individu sain sur la différenciation des MSC. La figure B représente les conséquences de ce que l'on observe dans le cadre du MM.

Ces différences d'expression de gènes semblent indiquer un défaut de différenciation osseuse des MSC issues de patients présentant un MM par rapport aux MSC issues de donneurs sains. Ce défaut ne semble pas s'accompagner d'un gain de différenciation adipocytaire. D'après la littérature, DKK1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire des MSC mais cette implication potentielle n'est pas clairement retrouvée dans notre analyse comparative. En effet, les gènes de différenciation adipocytaire ne sont pas différentiellement exprimés dans les MSC issues de patients présentant un MM par rapport aux MSC issues de donneurs sains. Concernant la voie de signalisation impliquée dans la coagulation sanguine, on retrouve principalement des gènes surexprimés. La SERPINB2 est retrouvée 31 fois plus exprimée dans les MSC post traitement par rapport aux MSC saines et 15 fois plus exprimée dans les MSC de diagnostic. La SERPINB2 aussi appelée « plasminogen activator inhibitor-2 » (PAI2), est un facteur de la coagulation qui inactive l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Dans des souris déficientes pour PAI2, on retrouve une résolution des thromboses veineuses(120). Il va permettre de réguler la formation des thrombus en inhibant la fibrinolyse et la thrombolyse. Les 2 types de SERPIN, E1 (PAI1) et B2 (PAI2), ont été décrites dans les cancers. PAI1 est plutôt décrite comme favorisant la progression tumorale alors qu'une augmentation de PAI2 est associée à une diminution de la croissance tumorale et des métastases(121). Dans notre cas, PAI1 et PAI2 sont retrouvés surexprimés par les MSC de MM par rapport aux donneurs sains. La surexpression de la SERPINB2, dans ce cas, pourrait être corrélée aux signes cliniques des patients. En effet, dans le myélome on retrouve des risques thrombo-emboliques importants souvent accentués par la chimiothérapie.

Les intégrines ont pour fonction principale d'attacher les cellules à la matrice extracellulaire mais aussi de transduire des signaux entre la matrice et la cellule. Les intégrines se retrouvent dans les MM-MSC dérégulées, certaines sont surexprimées tandis que d'autres sont sous exprimées.

Ces résultats nous amènent à penser que, même après le traitement, les MSC gardent un phénotype plutôt pro-tumoral et pourraient être impliquées dans la rechute du patient. Il serait intéressant de confirmer ces résultats par des analyses *in vitro* sur les MSC. Il faudrait confirmer que suite au traitement, elles perdent cette capacité à se différencier en ostéoblastes. Il serait aussi intéressant de voir si leur capacité de différenciation en d'autres types cellulaires comme les adipocytes ou les chondroblastes se retrouve également

perturbée. Si les résultats se confirment *in vitro*, l'utilisation d'un inhibiteur de DKK1 pourrait, par exemple, être testé pour essayer de restaurer cette capacité de différenciation en ostéoblastes que ce soit *in vitro*, ou *in vivo* sur des modèles murins. L'utilisation de souris transgéniques avec des MSC KO pour DKK1 pourrait s'avérer intéressante.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med.* 6 avr 2017;376(14):1311-20.
2. Kyle RA. Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine.* 2004;14.
3. Antonio P, Kenneth A. Multiple Myeloma. *n engl j med.* 2011;15.
4. Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, Derolf ÅR, Björkholm M. Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology.* 20 mai 2007;25(15):1993-9.
5. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [Internet]. Disponible sur: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/)
6. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. 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. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013.
7. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology.* 20 mai 2005;23(15):3412-20.
8. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology.* nov 2014;15(12):e538-48.
9. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 12 mai 2011;117(19):5019-32.
10. 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. *British Journal of Haematology.* juin 2003;121(5):749-57.
11. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *JCO.* 10 sept 2015;33(26):2863-9.
12. Chretien M-L, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood.* 17 déc 2015;126(25):2713-9.
13. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, Roussel M, Caillot D, Marit G, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia.* mars 2014;28(3):675-9.
14. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, Caillot D, Hulin C, Marit G, et al. Long-Term Analysis of the IFM 99 Trials for Myeloma: Cytogenetic Abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] Play a Major Role in Defining Long-Term Survival. *JCO.* juin 2012;30(16):1949-52.
15. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology.* nov 2014;15(12):e538-48.
16. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine.* 21 févr 2002;346(8):564-9.
17. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined

- significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*. oct 2009;23(10):1691-7.
18. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 28 mai 2009;113(22):5418-22.
  19. Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA, Kyle RA, Ahmadizadeh I, Clark R, et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: a population-based study of 12 482 persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia*. juill 2014;28(7):1537-42.
  20. Smith A, Wisloff F, Samson D, the UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *British Journal of Haematology*. févr 2006;132(4):410-51.
  21. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. janv 2009;23(1):3-9.
  22. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Melton LJ, Colby CL, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet*. mai 2010;375(9727):1721-8.
  23. Jelinek T, Kryukov F, Rihova L, Hajek R. Plasma cell leukemia: from biology to treatment. *European Journal of Haematology*. juill 2015;95(1):16-26.
  24. Mina R, D'Agostino M, Cerrato C, Gay F, Palumbo A. Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leukemia & Lymphoma*. 3 juill 2017;58(7):1538-47.
  25. Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2017 Update on diagnosis, risk stratification, and management: DISPENZIERI. *American Journal of Hematology*. août 2017;92(8):814-29.
  26. Paiva B, Chandia M, Vidriales M-B, Colado E, Caballero-Velazquez T, Escalante F, et al. Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: new criteria for risk of progression to myeloma. *Blood*. 21 août 2014;124(8):1300-3.
  27. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, Anderson LA, Brenner H, Holleccek B, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *The Lancet Oncology*. août 2014;15(9):931-42.
  28. Kyle RA, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. juin 2010;24(6):1121-7.
  29. Wood AJJ, Alexanian R, Dimopoulos M. The Treatment of Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 17 févr 1994;330(7):484-9.
  30. HAS. Commission de la Transparence, LEVACT [Internet]. 2016. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-15032\\_LEVACT\\_PIC\\_REEV\\_Avis3\\_CT15032.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-15032_LEVACT_PIC_REEV_Avis3_CT15032.pdf)
  31. Pönisch W, Mitrou PS, Merkle K, Herold M, Assmann M, Wilhelm G, et al. Treatment of Bendamustine and Prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with Melphalan and Prednisone—a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. avr 2006;132(4):205-12.
  32. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary Dexamethasone Treatment of Multiple Myeloma. 1992;5.
  33. Attal M, Harousseau J-L, Stoppa A-M, Sotto J-J, Fuzibet J-G, Rossi J-F, et al. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and

- Chemotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 11 juill 1996;335(2):91-7.
34. Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2009;2(1):36.
  35. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. août 1975;256(5517):495-7.
  36. HAS. Commission de la Transparence, DARZALEX, [Internet]. 2019. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-17516\\_DARZALEX\\_1ereligne\\_PIC\\_EI\\_Avis2\\_CT17516.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-17516_DARZALEX_1ereligne_PIC_EI_Avis2_CT17516.pdf)
  37. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 25 août 2016;375(8):754-66.
  38. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 6 oct 2016;375(14):1319-31.
  39. Richardson PG, Attal M, Campana F, Le-Guenec S, Hui A-M, Risse M-L, et al. Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncology*. mai 2018;14(11):1035-47.
  40. Jakubowiak A, Offidani M, Pegourie B, De La Rubia J, Garderet L, Laribi K, et al. Randomized phase 2 study: elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood*. 9 juin 2016;127(23):2833-40.
  41. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discovery*. avr 2013;3(4):388-98.
  42. Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol*. mai 2013;10(5):267-76.
  43. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *Journal of Clinical Investigation*. 29 avr 2019;129(6):2210-21.
  44. Leleu X, Micol JB, Guieze R, Berthon C, Kuhnovsky F, Terriou L, et al. Thalidomide : mécanismes d'action et indications en hématologie. *La Revue de Médecine Interne*. févr 2005;26(2):119-27.
  45. Fouquet G, Macro M, Decaux O, Fohrer C, Guidez S, Demarquette H, et al. [Pomalidomide for multiple myeloma]. *Rev Med Interne*. sept 2015;36(9):613-8.
  46. Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, et al. The Proteasome Inhibitor PS-341 Markedly Enhances Sensitivity of Multiple Myeloma Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents. 2003;10.
  47. Richardson PG, Irwin D, Harousseau J-L, Goldschmidt H, Bladé J, Dalton WS, et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2005;12.
  48. Orłowski RZ, Zeger EL. Targeting the proteasome as a therapeutic strategy against haematological malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. févr 2006;15(2):117-30.
  49. HAS. Commission de la Transparence, KYPROLIS [Internet]. 2018. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16445\\_KYPROLIS\\_PIC\\_REEV\\_Avis3\\_CT16445.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16445_KYPROLIS_PIC_REEV_Avis3_CT16445.pdf)
  50. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Masszi T, Špička I, Oriol A, et al. Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 8 janv 2015;372(2):142-52.
  51. HAS. Commission de la Transparence, NINLARO, [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT->



15988\_NINLARO\_PIC\_INS\_Avis3\_CT15988.pdf

52. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, et al. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 28 avr 2016;374(17):1621-34.
53. Richon VM. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *British Journal of Cancer*. déc 2006;95(S1):S2-6.
54. Dimopoulos M, Siegel DS, Lonial S, Qi J, Hajek R, Facon T, et al. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *The Lancet Oncology*. oct 2013;14(11):1129-40.
55. HAS. Commission de la Transparence, FARYDAK, [Internet]. 2016. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-14710\\_FARYDAK\\_PIC\\_INS\\_Avis3\\_CT14710.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-14710_FARYDAK_PIC_INS_Avis3_CT14710.pdf)
56. San-Miguel JF, Hungria VTM, Yoon S-S, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. oct 2014;15(11):1195-206.
57. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, Weber DM, Coutre SE, Gasparetto C, et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 3 oct 2013;122(14):2331-7.
58. Ghobrial IM, Weller E, Vij R, Munshi NC, Banwait R, Bagshaw M, et al. Weekly bortezomib in combination with temsirolimus in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, phase 1/2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet Oncology*. mars 2011;12(3):263-72.
59. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Cocks K, Bell SE, Szubert AJ, et al. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *The Lancet*. déc 2010;376(9757):1989-99.
60. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *JCO*. 20 mars 2011;29(9):1125-32.
61. ONCOMIP. Référentiel de traitement du Myélome Multiple [Internet]. Onco-occitanie. 2017. Disponible sur: [https://www.onco-occitanie.fr/pro/referentiels-recommandations?field\\_specialites\\_target\\_id\[\]=26&title=myelome](https://www.onco-occitanie.fr/pro/referentiels-recommandations?field_specialites_target_id[]=26&title=myelome)
62. Mateos M-V, Hernandez JM, Hernandez MT, Gutierrez NC, Palomera L, Fuertes M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica*. 1 avr 2008;93(4):560-5.
63. Durie B, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. sept 2006;20(9):1467-73.
64. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. août 2016;17(8):e328-46.
65. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 15 nov

2008;112(10):4017-23.

66. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien M-L, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 6 déc 2018;132(23):2456-64.
67. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. mars 2011;144(5):646-74.
68. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. :15.
69. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: Cloning In Vitro and Replantation In Vivo. *Transplantation*. avr 1974;17(4):331-40.
70. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. sept 1991;9(5):641-50.
71. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
72. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. avr 2006;24(4):150-4.
73. Li S, Huang K-J, Wu J-C, Hu MS, Sanyal M, Hu M, et al. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Candidate Cells Responsible for Healing Critical-Sized Calvarial Bone Defects: Blood-Derived MSCs in Calvarial Bone Healing. *STEM CELLS Translational Medicine*. avr 2015;4(4):359-68.
74. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. déc 2011;9(1):12.
75. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep*. déc 2018;8(1):5014.
76. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. févr 2006;6(2):93-106.
77. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 25 juin 2009;113(26):6576-83.
78. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. oct 2013;13(4):392-402.
79. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. févr 2008;2(2):141-50.
80. Castells M, Thibault B, Mery E, Golzio M, Pasquet M, Hennebelle I, et al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Letters*. déc 2012;326(1):59-68.
81. Naour AL, Prat M, Thibault B, Mével R, Lemaitre L, Leray H, et al. Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors. *Journal of Molecular Cell Biology*. 3 sept 2019;mjz090.
82. Espagnolle N, Balguerie A, Arnaud E, Sensebé L, Varin A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*. avr 2017;8(4):961-76.
83. J. Centeno C, R. Schultz J, Cheever M, Freeman M, Faulkner S, Robinson B, et al. Safety and Complications Reporting Update on the Re-Implantation of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells Using Autologous Platelet Lysate Technique. *CSCR*. 1 déc 2011;6(4):368-78.

84. Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells: A Pilot Study. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. juin 2004;86A(6):1153-60.
85. Peeters CMM, Leijns MJC, Reijman M, van Osch GJVM, Bos PK. Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review. *Osteoarthritis and Cartilage*. oct 2013;21(10):1465-73.
86. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, Munar A, et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation*. août 2015;99(8):1681-90.
87. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial. *JAMA*. 12 déc 2012;308(22):2369.
88. Shpichka A, Butnaru D, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Atala A, Burdukovskii V, et al. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res Ther*. déc 2019;10(1):94.
89. Venkataramana NK, Pal R, Rao SAV, Naik AL, Jan M, Nair R, et al. Bilateral Transplantation of Allogenic Adult Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into the Subventricular Zone of Parkinson's Disease: A Pilot Clinical Study. *Stem Cells International*. 2012;2012:1-12.
90. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult Human Mesenchymal Stem Cells Added to Corticosteroid Therapy for the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. juill 2009;15(7):804-11.
91. Ciavarella S, Caselli A, Tamma AV, Savonarola A, Loverro G, Paganelli R, et al. A Peculiar Molecular Profile of Umbilical Cord-Mesenchymal Stromal Cells Drives Their Inhibitory Effects on Multiple Myeloma Cell Growth and Tumor Progression. *Stem Cells and Development*. 15 juin 2015;24(12):1457-70.
92. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells*. oct 2009;27(10):2614-23.
93. Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, et al. CCR2-Dependent Recruitment of Macrophages by Tumor-Educated Mesenchymal Stromal Cells Promotes Tumor Development and Is Mimicked by TNF $\alpha$ . *Cell Stem Cell*. déc 2012;11(6):812-24.
94. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. mai 2008;15(10):730-8.
95. Mandel K, Yang Y, Schambach A, Glage S, Otte A, Hass R. Mesenchymal Stem Cells Directly Interact with Breast Cancer Cells and Promote Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Stem Cells and Development*. déc 2013;22(23):3114-27.
96. Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF- $\beta$  family. *Nat Rev Genet*. oct 2003;4(10):763-73.
97. Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltsis-Mortari A, Masellis AM. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. :12.
98. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne M-N, Crinquette A, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*. janv 2007;21(1):158-63.
99. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. mai 2007;21(5):1079-88.
100. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, et al. Mesenchymal

stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*. janv 2007;48(10):2032-41.

101. Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA. A Crosstalk Between Myeloma Cells and Marrow Stromal Cells Stimulates Production of DKK1 and Interleukin-6: A Potential Role in the Development of Lytic Bone Disease and Tumor Progression in Multiple Myeloma. *STEM CELLS*. avr 2006;24(4):986-91.

102. Garcia-Gomez A, Rivas JDL, Ocio EM, Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Martín M, et al. Transcriptomic profile induced in bone marrow mesenchymal stromal cells after interaction with multiple myeloma cells: implications in myeloma progression and myeloma bone disease. *Oncotarget* [Internet]. 30 sept 2014 [cité 19 oct 2019];5(18). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/2058>

103. Corre J, Labat E, Espagnolle N, Hebraud B, Avet-Loiseau H, Roussel M, et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Research*. 15 mars 2012;72(6):1395-406.

104. Garayoa M, Garcia JL, Santamaria C, Garcia-Gomez A, Blanco JF, Pandiella A, et al. Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia*. août 2009;23(8):1515-27.

105. André T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Pieters K, Bron D, et al. Evidences of Early Senescence in Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Covas DT*, éditeur. *PLoS ONE*. 21 mars 2013;8(3):e59756.

106. Giallongo C, Tibullo D, Parrinello NL, La Cava P, Di Rosa M, Bramanti V, et al. Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC). *Oncotarget* [Internet]. 27 déc 2016 [cité 20 oct 2019];7(52). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7969>

107. Zdzisińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, Kandefér-Szerszeń M. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. *Arch Immunol Ther Exp*. juin 2008;56(3):207-21.

108. McNee G, Eales KL, Wei W, Williams DS, Barkhuizen A, Bartlett DB, et al. Citrullination of histone H3 drives IL-6 production by bone marrow mesenchymal stem cells in MGUS and multiple myeloma. *Leukemia*. févr 2017;31(2):373-81.

109. Wang X, Zhang Z, Yao C. Survivin is upregulated in myeloma cell lines cocultured with mesenchymal stem cells. *Leukemia Research*. oct 2010;34(10):1325-9.

110. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai Y-T, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest*. 1 avr 2013;123(4):1542-55.

111. Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ, et al. Anti- $\alpha$ 4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood*. 1 oct 2004;104(7):2149-54.

112. Li B, Fu J, Chen P, Zhuang W. Impairment in Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients. *Archives of Medical Research*. nov 2010;41(8):623-33.

113. Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, Izaki M, Yuki H, Okuno Y, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *International Journal of Oncology*. sept 2012;41(3):876-84.

114. Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, Oberländer R, Rademacher J, Jakob C, et al. Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma: Serum DKK-1 correlates with myeloma bone disease. *European Journal of Haematology*. juin 2008;80(6):490-4.

115. Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD, et al. Dickkopf Homolog 1 Mediates Endothelin-1-Stimulated New Bone Formation. *Molecular Endocrinology*. 1 févr 2007;21(2):486-98.
116. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 25 déc 2003;349(26):2483-94.
117. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang Y-W, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*. 15 janv 2009;113(3):517-25.
118. Christodoulides C. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *Journal of Cell Science*. 15 juin 2006;119(12):2613-20.
119. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, et al. Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating *Runx2* Gene Expression. *J Biol Chem*. 30 sept 2005;280(39):33132-40.
120. Siefert SA, Chabasse C, Mukhopadhyay S, Hoofnagle MH, Strickland DK, Sarkar R, et al. Enhanced venous thrombus resolution in plasminogen activator inhibitor type-2 deficient mice. *J Thromb Haemost*. oct 2014;12(10):1706-16.
121. Croucher DR, Saunders DN, Lobov S, Ranson M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nature Reviews Cancer*. juill 2008;8(7):535-45.
122. Yagci M, Sucak GT, Haznedar R. Fibrinolytic activity in multiple myeloma. *Am J Hematol*. déc 2003;74(4):231-7.