



HAL
open science

Analyse du mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) dans le contexte du myelome multiple

Amandine Deroncourt-Bellenguez

► **To cite this version:**

Amandine Deroncourt-Bellenguez. Analyse du mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) dans le contexte du myelome multiple. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-02962198

HAL Id: dumas-02962198

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02962198>

Submitted on 9 Oct 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.

Université de Picardie Jules Verne

Faculté de Médecine d'Amiens

Année 2020

Thèse N°2020-84

**ANALYSE DU MESENCEPHALIC ASTROCYTE-
DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (MANF) DANS
LE CONTEXTE DU MYELOME MULTIPLE**

THESE D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Mention Spécialité : Médecine interne

Soutenue publiquement le 4 septembre 2020

Par Madame Amandine DERNONCOURT-BELLENGUEZ

Président du Jury :

Monsieur le Professeur Pierre DUHAUT

Juges :

Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU

Monsieur le Professeur Jean SCHMIDT

Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Valéry SALLE

Remerciements

Monsieur le Professeur Pierre DUHAUT

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Médecine interne)

Chef du service de Médecine interne et maladies systémiques

Pôle "Médico-chirurgical digestif, rénal, infectieux, médecine interne et endocrinologie"
(D.R.I.M.E)

Je tenais à vous remercier sincèrement pour toute la bienveillance que vous avez eue à mon égard depuis le début de mon internat. Vous avez toujours su écouter et apaiser mes inquiétudes. Vous n'avez cessé de croire en moi et j'ai toujours pu vous faire confiance. Je vous promets de tout faire pour y arriver.

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Hématologie clinique)
Chef du service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire
Chef du Pôle « Oncopôle »

Le semestre en Hématologie restera l'un des meilleurs de mon internat. Je vous remercie pour votre chaleureux accueil et d'avoir pensé à moi pour des projets de recherche.

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Biologie)
Chef du Service de Biochimie (Centre de Biologie Humaine)

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour mes stages de Master et de m'avoir proposé ce sujet sur MANF. Je vous remercie également de m'avoir permis d'intégrer les résultats de votre analyse *in silico* dans ce travail.

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Jean SCHMIDT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Médecine interne)

Un immense merci pour votre contribution à ce travail mais aussi pour votre gentillesse, votre patience et votre disponibilité tout au long de mon internat. Vous êtes sincèrement un exemple pour tous les internes de Médecine interne et moi-même. J'espère avoir la chance de travailler encore longtemps avec vous.

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Monsieur le Docteur Valéry SALLE

Praticien hospitalier (Médecine interne)

Il ne me paraît pas si loin le temps où je faisais fonction d'aide-soignante un été en Médecine interne, où on rigolait déjà bien ensemble. Tu m'avais expliqué comment interpréter une radiographie de thorax sur le négatoscope (à l' « époque », les clichés étaient imprimés). Il y a eu ensuite une histoire de Louboutins ;), puis je t'ai fait goûter ma fameuse carbonnade flamande Et maintenant, tu me fais l'honneur d'être mon directeur de thèse. Ce projet n'aurait pu être possible sans toi.

Table des matières

Abréviations	3
I) INTRODUCTION	5
A. Généralités sur le Myélome Multiple (MM)	5
1. Définition	5
2. Epidémiologie.....	5
3. Critères diagnostiques	6
4. Facteurs pronostiques.....	6
5. Progrès et limites thérapeutiques	6
B. L'Unfolded Protein Response (UPR) dans le contexte du MM.....	7
1. La protéostase cellulaire.....	7
2. L' <i>Unfolded Protein Response</i>	8
3. L'UPR dans la physiologie des plasmocytes	10
4. L'UPR dans la pathogénèse du MM.....	11
C. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF), possible biomarqueur de la protéostase altérée des plasmocytes malins ?	12
1. Médecine de précision et identification de biomarqueurs de l'UPR	12
2. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF).....	13
3. Régulation de MANF par l'UPR	14
4. Rôles physiopathologiques de MANF	14
5. MANF comme biomarqueur de l'UPR.....	15
6. Objectifs de cette étude	17
II) MATERIEL ET METHODES	18
A. Analyse <i>in silico</i>	18
B. Culture cellulaire	18
C. Cohorte de patients	19
1. Population de sujets sains.....	19
2. Population de patients avec une gammopathie monoclonale	19
3. Cadre éthique.....	20
4. Critères de jugement	20
D. Dosage de la protéine MANF.....	20
E. Analyses statistiques	21
III) RESULTATS	22

A.	Analyse <i>in silico</i>	22
B.	Analyse <i>in vitro</i>	24
C.	Caractéristiques cliniques des sujets sains	25
D.	Caractéristiques cliniques et biologiques des patients avec une gammopathie monoclonale	25
1.	Groupe MGUS.....	26
2.	Groupe MM.....	26
E.	Concentration sérique de MANF.....	31
1.	Sujets sains	31
2.	Patients avec une gammopathie monoclonale	33
IV)	DISCUSSION.....	37
1.	Fonctions et variations physiologiques de MANF : un rôle possible dans le vieillissement.....	37
2.	MANF comme biomarqueur de pathologies humaines : des premières études encourageantes	38
3.	MANF dans le myélome multiple: nos résultats	39
4.	Le dosage de MANF serait-il pertinent en pratique clinique ?	41
5.	Limites de notre étude.....	42
6.	Perspectives	43
V)	CONCLUSION	44
	Bibliographie.....	45
	Annexes	54

Abréviations

aFP: alpha foetoprotéine

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATF: activating transcription factor

Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bax: Bcl-2-associated X protein

BIP: binding immunoglobulin protein

BZB: bortézomib

CHC: carcinome hépato-cellulaire

CHOP : C/EBP homologous protein

CHU: centre hospitalo-universitaire

CLL: chaîne légère libre

CNIL: commission nationale de l'informatique et des libertés

CRAB : critères CRAB (hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie, atteinte osseuse)

CRP: C-réactive protéine

eIF2: eukaryotic initiation factor 2

ERAD: ER-associated degradation

ERSE: ER stress response element

FA: fibrillation auriculaire

GRP78: glucose regulated protein 78

Hb: hémoglobine

Ig: immunoglobuline

IkB : inhibitor of NF-kB

IMC : indice de masse corporelle

IMWG: International Myeloma Working Group

IP: inhibiteur du protéasome

IRE1: inositol-requiring enzyme-1

ISS: international staging system

JNK: c-Jun kinase

LDH: lactate déshydrogénase

MANF: mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance
MM: myélome multiple
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
PERK: PKR-like ER associated protein kinase
RIDD: regulated IRE1 α -dependent decay of mRNA
R-ISS: revised international staging system
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
S1P: site-1 protease
sXBP1: spliced X-box-binding protein-1
TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
UPR: unfolded protein response
XBP1: X-box binding protein 1
 β 2m: bêta2microglobuline

I) INTRODUCTION

A. Généralités sur le Myélome Multiple (MM)

1. Définition

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne typiquement caractérisée par la prolifération clonale de plasmocytes malins dans la moelle osseuse pouvant altérer le fonctionnement de nombreux organes (1,2). Ces plasmocytes tumoraux sécrètent pour la plupart une immunoglobuline (Ig) monoclonale ou un fragment d'Ig (chaîne légère libre CLL) pouvant être décelés dans le sang et/ou les urines (1,2). Le MM est presque toujours précédé par un stade pré-myélomateux asymptomatique appelé « gammopathie monoclonale de signification indéterminée » (en anglais, *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* ou MGUS). La MGUS est caractérisée par la détection d'une Ig monoclonale à un taux modéré et par une plasmocytose médullaire clonale n'excédant pas le seuil de 10% (1,3).

2. Epidémiologie

Le MM est la deuxième hémopathie maligne la plus fréquente, après le lymphome malin non hodgkinien, dans les pays dits développés. Son incidence varie globalement de 0,4 (Asie) à 6,7 pour 100 000 habitants (Amérique du Nord, Australie/Nouvelle Zélande et Europe) (4,5). Il représente ainsi 0,8% de l'ensemble des cancers tous sexes confondus dans le Monde (62 000 nouveaux cas chez l'homme et 52 000 chez la femme en 2012) soit 13% des hémopathies malignes (1,2,4,5). L'âge médian au diagnostic est de 69 ans (seulement 37% des patients ont moins de 65 ans et 2% moins de 40 ans) (2,5). En 2012, le MM était responsable de 80 000 décès, soit 1% des décès par cancer dans le Monde (4).

La MGUS est présente dans 3 à 4% de la population âgée de plus de 50 ans (1,3). Le risque de progression vers un MM est homogène et estimé à 1% par an (3). Cependant, ce risque varie en fonction du type et du taux d'Ig monoclonale, du ratio CLL kappa/lambda, de l'importance de l'infiltration plasmocytaire et de la proportion d'anomalies génotypiques. De plus, l'évolution vers un MM persiste même après 25 ans de suivi (3).

3. Critères diagnostiques

Les définitions du MM (indolent et symptomatique) et de la MGUS ont été mises à jour en 2014 par l'International Myeloma Working Group (IMWG) et sont résumées en **Annexe A** (6). La présence d'un pic monoclonal n'est pas nécessaire pour le diagnostic de MM mais est utilisée pour classer le myélome en type sécrétant ou non sécrétant. L'instauration immédiate d'un traitement n'est pas recommandée pour les patients présentant un MM indolent. Ces patients doivent cependant bénéficier d'une surveillance régulière. En effet, le risque de progression vers un MM symptomatique est de 10% par an dans les cinq premières années de suivi, puis de 3% par an les cinq années suivantes, puis de 1% par an les dix années suivantes.

Parallèlement aux entités décrites ci-dessus, il existe d'autres dyscrasies plasmocytaires que nous ne développerons pas ici (6): MGUS à IgM, MGUS à chaînes légères, POEMS syndrome, plasmocytome solitaire et amylose systémique AL.

4. Facteurs pronostiques

Le score ISS (*International Staging System*), proposé en 2005 (8) et détaillé dans l'**Annexe B**, permet de stratifier les patients selon deux paramètres : les dosages sériques de la bêta-2microglobuline (β 2m) et de l'albumine. Certaines anomalies chromosomiques du génome plasmocytaire, détectées par hybridation *in situ* en fluorescence (ou FISH) sont également associées à un mauvais pronostic, à savoir une délétion del(17p), une translocation t(4;14)(p16;q32) et une translocation t(14;16)(q32;q23). Ainsi, la maladie dite à « haut risque » est caractérisée par la présence d'au moins une de ces anomalies et est associée à une médiane de survie de 24,5 mois (contre 50,5 mois en cas de maladie dite à « risque standard ») (8). L'IMWG a récemment proposé un nouvel algorithme pour évaluer le pronostic des patients nouvellement diagnostiqués MM (8), appelé R-ISS (*Revised International Staging System*), combinant le score ISS, les anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic et le taux de lactate déshydrogénase (LDH) considéré comme le reflet de la masse tumorale (**Annexe B**).

5. Progrès et limites thérapeutiques

Le premier traitement efficace du MM a été introduit à la fin des années 60 et consistait en une association de melphalan, un agent alkylant, et de prednisone (1,2). A partir des années 80, les

stratégies thérapeutiques ont reposé sur différentes chimiothérapies à hautes doses (ex: vincristine, cyclophosphamide, dexaméthasone). Puis le développement de l'injection autologue de cellules souches hématopoïétiques (ou autogreffe) a permis d'améliorer la survie mais reste encore à ce jour réservé aux patients jeunes et peu comorbides (1,2,9). Le pronostic des patients a été aussi nettement amélioré à la fin des années 90 par le développement des immunomodulateurs ou Imids (à savoir le thalidomide et son homologue lenalidomide, puis plus tard le pomalidomide) puis par l'émergence en 2003 du bortézomib (BZB), un inhibiteur du protéasome (IP) de première génération (10,11). Depuis quelques années, d'autres agents sont disponibles pour la prise en charge du MM réfractaire ou en rechute (2,12) tels que les IPs de 2^e génération ou les anticorps monoclonaux anti-CD38, tel que le daratumumab. Enfin, de nombreuses thérapies innovantes sont actuellement en cours d'évaluation préclinique voire clinique (e.g. inhibiteurs des histones désacétylases, *CAR-T cells*) (12).

Le MM est une maladie complexe associée à de nombreuses altérations chromosomiques, génétiques et épigénétiques contribuant au phénotype de la maladie. Grâce aux progrès thérapeutiques, la médiane de survie a augmenté de 3 à 6 ans ces vingt dernières années (1,2,13). La survie globale à 5 ans dans les pays développés est ainsi estimée à 50,7% (5). Cependant, le MM est toujours considéré comme une maladie non curable. L'apparition de résistance au début ou au cours du traitement est fréquente et presque tous les patients rechutent à plus ou moins long terme. (1,9,14). Les mécanismes exacts à l'origine de ces résistances sont multiples et ne sont pas encore parfaitement compris. Des travaux récents ont mis en lumière le rôle de l'*unfolded protein response* (UPR) dans la biologie du MM et l'échappement aux chimiothérapies antimyéломateuses.

B. L'Unfolded Protein Response (UPR) dans le contexte du MM

1. La protéostase cellulaire

L'homéostasie des protéines, appelée aussi protéostase cellulaire, est assurée par un ensemble de mécanismes régulés de manière complexe (15,16). Ces mécanismes comprennent la biogénèse, le repliement, le contrôle qualité, le transport et la dégradation des protéines au sein de la cellule (15,16). Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite ayant un rôle majeur dans le maintien de la protéostase en orchestrant notamment la traduction de l'ARNm en protéine et la maturation conformationnelle des protéines sécrétées et membranaires (17–20). Un tiers des polypeptides naissant transitent par le RE. Ils vont y subir un ensemble de

modifications post-traductionnelles par l'intervention d'enzymes et de protéines chaperonnes du RE. Ils pourront ainsi acquérir leur conformation mature avant d'être conduits vers l'appareil de Golgi pour être ensuite sécrétés (17–20). Par exemple, durant leur transit à travers le RE, les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines néosynthétisées s'associent avec deux protéines chaperonnes du RE : BiP (*binding immunoglobulin protein*, aussi appelée *glucose regulated protein 78* ou GRP78) et Grp94 (21). Certaines protéines chaperonnes sont impliquées dans le système de contrôle qualité permettant de détecter les protéines mal repliées. Celles-ci sont alors rétro-transloquées vers le cytosol et sont dégradées via l'*ER-associated degradation* (ERAD) par le protéasome 26S (17–19). Dans divers contextes physiologiques ou pathologiques (détaillés plus bas), des protéines mal repliées peuvent s'accumuler dans la lumière du RE, dépassant le seuil critique de la cellule, ce qui engendre un « stress du RE » (ou *ER-stress* en anglais). Les cellules possèdent un système de surveillance complexe pour détecter le stress du RE avant qu'il ne mette en danger la survie cellulaire. La restauration de l'homéostasie du RE repose alors sur l'activation d'une réponse physiologique adaptative appelée *l'unfolded protein response* ou UPR (17–19).

2. L'Unfolded Protein Response

L'UPR est un ensemble de trois voies de transduction qui rétablissent la protéostase cellulaire en ralentissant la synthèse protéique globale, en favorisant la synthèse de nouvelles protéines chaperonnes et en entraînant les protéines anormales vers la dégradation *via* l'ERAD (17–19). L'existence d'une réponse adaptative induite par le stress du RE a été découverte dans les années 80 (22). Chez les mammifères, cette réponse adaptative est médiée par trois « capteurs de stress » à savoir PERK (23) (*PKR-like ER associated protein kinase*), ATF6 (24) (*activating transcription factor-6*) et IRE-1 α (25) (*inositol-requiring enzyme-1*) (**Schéma 1**).

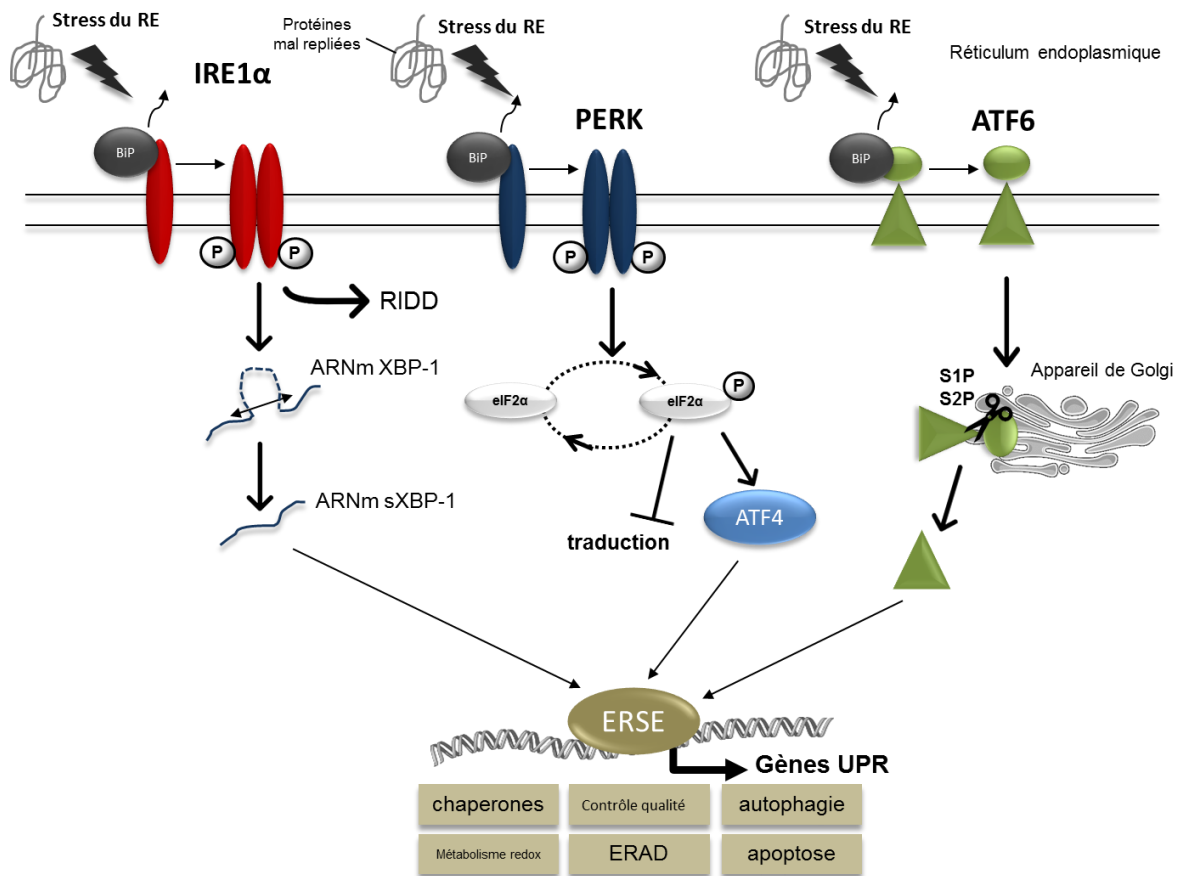


Schéma 1. Représentation schématique des trois voies de l'Unfolded Protein Response (UPR)

ARNm : acide ribonucléique messager, ATF : activating transcription factor, BiP : Binding immunoglobulin Protein, eIF2α : eukaryotic initiation factor 2 α, ERAD: ER-associated degradation, ERSE : ER stress response element, IRE1α : inositol-requiring enzyme-1, PERK : PKR-like ER associated protein kinase, RE: reticulum endoplasmique, RIDD : regulated IRE1α-dependent decay of mRNA, S1P: site-1 protease, S2P: site-2 protease, XBP-1 : X-box binding protein 1.

A l'état basal, ces trois protéines trans-membranaires du RE sont maintenues inactives grâce à leur interaction avec la protéine chaperonne BiP (17–19). L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne une dissociation de BiP et l'activation des trois voies. PERK activée phosphoryle le facteur eIF2α (*eukaryotic initiation factor 2*) empêchant la formation du complexe de pré-initiation de la traduction (17–19,23). IRE-1α est une nucléase qui, après activation, s'oligomérisse et s'autophosphoryle acquérant ainsi son activité endoribonucléasique qui va s'appliquer de deux façons. D'une part, IRE-1α catalyse le clivage de l'ARNm du facteur de transcription XBP-1 (*X-box binding protein 1*) et favorise ainsi la synthèse d'un variant épissé appelé sXBP-1 (17–19,25). Ce variant se fixe alors sur des séquences ERSE (*ER stress response element*) présentes au sein des promoteurs de gènes codant des protéines chaperonnes du RE (17–19,25). Parallèlement à la régulation de l'épissage de sXBP1, IRE1α est impliquée dans la dégradation de plusieurs ARNm codant différentes

protéines sécrétées, dans le but de diminuer le flow de protéines naissantes au sein du RE. Ce processus est appelé en anglais *regulated IRE1 α -dependent decay of mRNA* ou RIDD (17,19,20). Enfin, après dissociation de BiP du facteur ATF6, celui-ci migre du RE vers l'appareil de Golgi où il subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P (17–19,24). Le domaine amino-terminal d'ATF6 ainsi libéré, migre vers le noyau pour se fixer sur des séquences ERSE (17–19,24). Pour résumer, les voies IRE-1 α et ATF6 régulent la protéostase en contrôlant la transcription de gènes spécifiques tandis que la voie PERK/P-eIF2 α réduit le niveau général de synthèse des protéines. Lorsque ces mécanismes sont dépassés, ces voies peuvent conduire à l'activation d'une « UPR terminale » conduisant la cellule vers les voies de mort telles que l'apoptose ou l'autophagie par activation de caspases *via* les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, CHOP et/ou c-Jun kinase (JNK) (17–19).

3. L'UPR dans la physiologie des plasmocytes

Les plasmocytes sont les effecteurs matures et terminaux de la réponse immunitaire humorale spécialisés dans la production et la sécrétion de grandes quantités d'Ig (21). La réponse UPR joue un rôle majeur dans les cellules à forte capacité sécrétrice comme les plasmocytes, les cellules β des îlots pancréatiques ou les hépatocytes qui sont soumis à un stress constant du RE (17,19,20). La synthèse protéique accrue au sein de ces cellules nécessite alors un haut développement de la machinerie sécrétoire et une adaptation des capacités de repliement du RE afin d'éviter l'accumulation délétère de protéines malformées (17,18,20,26–28). Plusieurs études ont montré que les plasmocytes étaient dépendants pour leur différenciation et leur activité sécrétoire d'une UPR fonctionnelle (26,29–33). XBP1 est le premier facteur de transcription découvert requis de façon sélective et spécifique pour la différenciation terminale des lymphocytes B (32). Gass et al ont ainsi mis en évidence une augmentation de l'expression de XBP1 et de protéines chaperonnes de l'UPR, dont BiP, ainsi qu'une activation du facteur ATF6 dans la phase précoce du processus de maturation des lymphocytes B activés en plasmocytes (29). L'activation basale des principaux composants de l'UPR ne résulte donc pas uniquement dans l'augmentation de production d'Ig naissants mais est également essentielle à l'initiation de la synthèse d'Ig (29). Dans des modèles murins consistant en des souris déficientes en XBP1, les lymphocytes B peuvent proliférer et former des centres germinatifs mais ne peuvent se différencier en plasmocytes matures et sont incapables de sécréter des Ig (30). L'expression de XBP1 est également suffisante pour induire les nombreux changements phénotypiques caractéristiques des plasmocytes notamment une

augmentation de la taille de la cellule et une expansion massive du RE (26). XBP1 a aussi un rôle dans la production d'interleukine 6 (IL-6), une cytokine essentielle à la survie des plasmocytes (31).

4. L'UPR dans la pathogénèse du MM

L'activation de l'UPR est habituellement perçue comme une réponse homéostatique qui permet aux tissus sains d'adapter leur métabolisme au contexte micro-environnemental (17–19). Cependant, l'UPR peut également être activée dans de nombreux types cellulaires subissant une transformation maligne souvent associée à un stress du RE (27,34–36). En effet, les cellules cancéreuses, du fait de leur croissance rapide, sont souvent soumises à des conditions de stress telles que l'hypoxie, la carence en nutriments, des perturbations du pH, une faible vascularisation ... responsables d'une accumulation de protéines anormales au sein du RE. Les cellules cancéreuses peuvent alors s'adapter à ces conditions extrêmes par activation de l'UPR (27,34–36). Ainsi, l'UPR a un impact non seulement dans la régulation sécrétoire des cellules cancéreuses mais intervient dans toutes les étapes clés de la carcinogénèse (**Schéma 2**) (27,34–37).

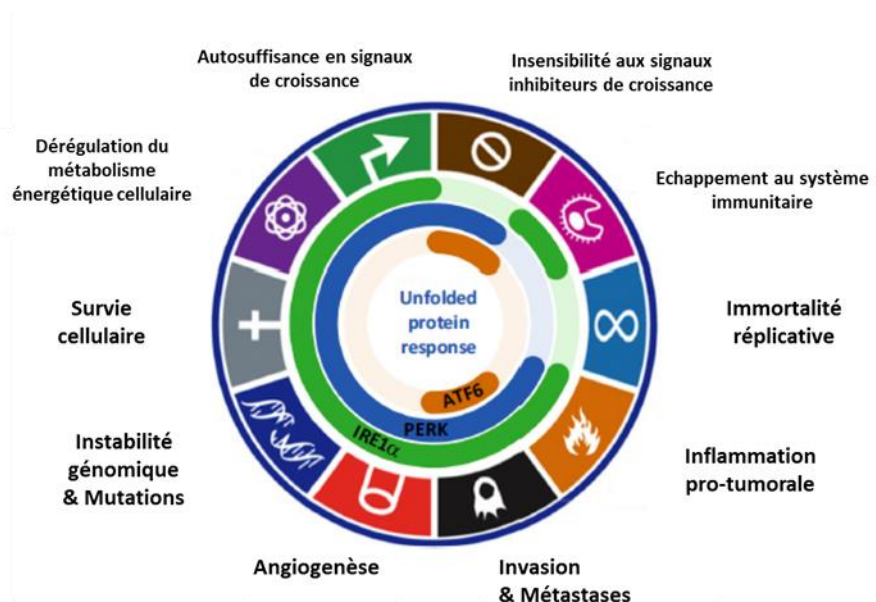


Schéma 2. L'UPR et les « Hallmarks » du Cancer, d'après Urra et al (37)

Carrasco et al ont mis en évidence l'importance de sXBP1 dans la pathogénèse du MM. Des souris transgéniques surexprimant sXBP1 développent spontanément en vieillissant des lésions typiques de MM (38). L'UPR serait ainsi une stratégie de survie des cellules myélomateuses leur permettant de s'adapter à l'augmentation de production de nouvelles générations de protéines (Ig et cytokines) et aux modifications du stroma (39). Ces résultats expliquent en partie l'effet cytotoxique relativement spécifique des IPs sur les cellules myélomateuses (40–42). Pour rappel, le protéasome 26S est un complexe enzymatique multiprotéique dont la fonction principale est de dégrader les protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes de manière ciblée (43). Un des effets anti-myélomateux du BZB repose notamment sur sa capacité d'inhiber le facteur anti-apoptotique NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) en empêchant la dégradation de sa protéine inhibitrice I κ B (*inhibitor of NF-kB*) par le protéasome (11,43). Cependant, il a été montré que les IPs peuvent également altérer l'homéostasie du RE en empêchant la clairance des protéines mal repliées par la voie de l'ERAD. Ils entraînent alors un stress sévère du RE non compensé par les voies de l'UPR conduisant à l'apoptose des plasmocytes malins (40–42).

Enfin, l'UPR est probablement un des déterminants de la réponse des cellules myélomateuses aux IPs. Une faible expression de XBP1 au diagnostic est en effet corrélée à une faible réponse au BZB *in vitro* (44,45). Des résultats similaires sont retrouvés en clinique chez des patients atteints d'un MM (46). Certaines cellules myélomateuses seraient ainsi moins dépendantes pour leur fonctionnement et leur survie de l'UPR (38–41). Les cellules myélomateuses qui sécrètent peu d'Ig apparaissent d'ailleurs plus résistantes au BZB (49). L'évaluation de l'UPR permettrait alors d'identifier précocement les patients à risque de résistance ou de rechute (46,47,50). De plus, l'UPR pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le développement de nouvelles molécules chez les patients myélomateux résistants aux chimiothérapies usuelles (42,51–53).

C. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF), possible biomarqueur de la protéostase altérée des plasmocytes malins ?

1. Médecine de précision et identification de biomarqueurs de l'UPR

Les progrès de la recherche ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la carcinogénèse. A l'heure de la médecine dite « de précision », la

caractérisation de biomarqueurs optimaux représente une évolution nécessaire pour aider à la décision médicale et permettre le développement de thérapies personnalisées. Selon le National Institute of Health, un biomarqueur est défini comme « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme indicateur des procédés biologiques normaux, des procédés pathogènes ou des réactions pharmacologiques à une intervention thérapeutique» (54). Les recherches actuelles tendent ainsi à identifier des biomarqueurs permettant une analyse clinique de l'activation de l'UPR (55,56). Les enjeux sont multiples et ambitieux : meilleure stratification des patients, prédiction de la réponse à un traitement et/ou suivi de son efficacité, sélection de patients nécessitant un traitement adjuvant, développement de thérapies ciblées... Historiquement, les taux sériques des marqueurs tumoraux mesurés en routine étaient considérés comme le reflet du volume tumoral, augmentant en cas de progression ou de rechute de la maladie et, au contraire, diminuant en cas de réponse au traitement anticancéreux (57,58). Cependant, ces marqueurs demeurent des protéines issues des cellules malignes et dont la synthèse et la sécrétion sont contrôlées par l'ensemble des mécanismes impliqués dans le maintien de la protéostase tumorale (59,60). L'exemple le plus séduisant est celui de l'alpha-foetoprotéine (aFP), premier biomarqueur tumoral à avoir été identifié. L'aFP est actuellement considérée comme le « gold standard » parmi les biomarqueurs tumoraux pour le diagnostic précoce du carcinome hépato-cellulaire (CHC) chez les patients à haut risque et dans le suivi de l'efficacité thérapeutique des patients avec un CHC (56). Néanmoins, il s'est révélé que les fluctuations des taux mesurés de l'aFP sous chimiothérapie, notamment sous sorafénib, ne seraient pas que le produit des variations de la masse hépatocytaire tumorale. Elles seraient également le reflet d'une activation sous-jacente de l'UPR chimio-induite (61) et permettraient de suivre l'efficacité du sorafénib par l'évaluation directe de la protéostase altérée des cellules de CHC. (36,37).

Dans ce travail, nous avons choisi d'évaluer la pertinence du *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) comme possible biomarqueur de l'UPR dans le contexte du MM.

2. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF)

MANF est une protéine soluble de 18kDa aussi appelée ARP (Arginine-rich protein) ou ARMET (Arginine rich mutated in early stage tumors) et a été décrite pour la première fois en 2003 par Petrova et al comme un nouveau facteur neurotrophique dopaminergique isolé dans

un milieu de culture conditionné d'astrocytes (62). L'ARNm et la protéine MANF sont exprimés à l'état basal dans de nombreux tissus mammaliens, neuronaux et non neuronaux, à des niveaux plus ou moins élevés (63,64). La protéine MANF est principalement intracellulaire, localisée surtout dans la lumière du RE et *a minima* dans l'appareil de Golgi (63,65), mais une faible quantité peut également être sécrétée dans le milieu extracellulaire (62,65) et serait accessible à un dosage dans le sang circulant et les urines (66–72).

3. Régulation de MANF par l'UPR

Le gène codant pour MANF (locus 3p21.2 chez l'Homme) a été identifié comme gène cible de l'UPR par analyse microarrays (65,73). Son promoteur possède deux séquences ERSE et ERSE-II reconnues par les facteurs de transcription XBP1 et ATF6 (63,74,75) (**Schéma 3**). L'expression et la sécrétion de la protéine MANF sont augmentées dans de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo* (e.g. neurones, cellules bêta des îlots pancréatiques, cardiomyocytes, synoviocytes, hépatocytes, cellules de la rétine) en réponse à des stimuli responsables d'un stress du RE : exposition à des agents chimiques utilisés expérimentalement pour activer l'UPR tels que la tunicamycine (63,65,75), l'hypoxie et l'ischémie (64,76–79), l'inflammation (75,80) ou l'accumulation de protéines mutantes (65,68).

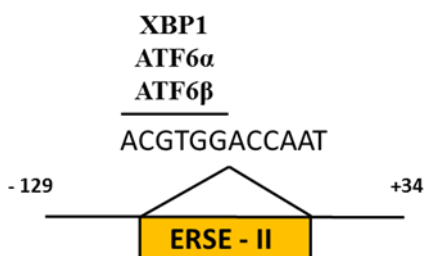


Schéma 3. Présence d'une séquence ERSE- II au niveau du promoteur du gène de MANF reconnue par les acteurs majeurs des voies transcriptionnelles de l'UPR

Schéma adapté selon Mizobuchi et al (63) et Oh-Hashi et al (74).

4. Rôles physiopathologiques de MANF

MANF a été découvert initialement pour son rôle trophique sur les neurones dopaminergiques (62). Ce rôle cytoprotecteur a été par la suite mis en évidence pour de nombreux types cellulaires (68,76–78,80–87). Plus précisément, MANF protégerait contre la mort cellulaire induite par une UPR terminale en réponse à un stress sévère du RE (62,68,75–

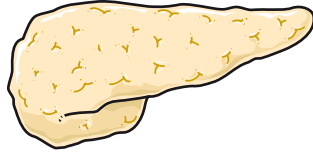
78,80–86,88). Cette régulation se ferait par un rétrocontrôle négatif par lequel MANF inhiberait en amont les différentes voies de l'UPR (84,89).

A l'instar du MM et d'autres cancers, le stress du RE et l'UPR participent à la pathogénèse de nombreuses et diverses pathologies humaines dont le diabète sucré, les pathologies neurodégénératives et neurovasculaires, les pathologies auto-immunes, la cardiopathie ischémique et certaines néphropathies (27,28). Du fait d'une co-régulation entre MANF et les voies de l'UPR, plusieurs équipes ont étudié la possibilité d'une implication de MANF dans la physiopathologie de ces maladies (62,66,68,70,77,78,80–86,89–96) (**Schéma 4**). Des travaux expérimentaux chez l'animal laissent même à espérer que MANF pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des pathologies médiées par le stress du RE (81,82,90).

5. MANF comme biomarqueur de l'UPR

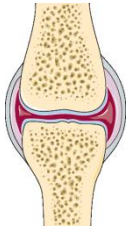
De façon intéressante, lors de situations responsables d'un stress du RE, les études sur lignées cellulaires montrent une expression augmentée des composants de l'UPR et de MANF mais seul MANF est sécrété et donc dosable dans le milieu extracellulaire (63,65,77). MANF pourrait représenter un biomarqueur d'intérêt du niveau de stress du RE, facilement quantifiable dans le sang. Des taux sériques élevés de MANF ont pour la première fois été mesurés chez des jeunes enfants atteints d'un diabète de type 1 au début de leur maladie (66). Le diabète de type 1 est lié à une destruction progressive des cellules β des îlots de Langerhans responsable d'une insulinopénie. A la phase précoce de la maladie, les cellules β préservées doivent accroître leur production d'insuline et l'augmentation de MANF pourrait refléter le stress du RE auquel sont soumises ces cellules (66). Par la suite, d'autres équipes ont mesuré des taux élevés de MANF dans le sérum de patients adultes diabétiques de type 2 (70) et de patients parkinsoniens (72) ou, au contraire, plus faibles chez des patients avec une fibrillation auriculaire (FA) (71).

Diabète



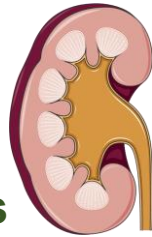
- *In vitro*: prolifération des $\zeta \beta$ lors de l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires [86] et protection contre le stress du RE induit par hyperglycémie [92]
- *In vivo*:
KO MANF : diabète secondaire à l'apoptose des $\zeta \beta$ par activation de l'UPR [84, 92]
Surexpression MANF : augmentation de la régénération des $\zeta \beta$ dans un modèle murin de diabète sucré [84, 92]
- Taux sérique de MANF élevé chez des enfants atteints d'un diabète de type 1 à la phase précoce [66] et chez des adultes intolérants au glucose et diabétiques de type 2 [70]

Pathologies auto-immunes



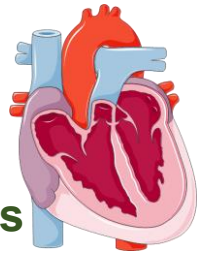
- *In vitro*: inhibition du signal NF- κ B [80,91,93] et orientation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire [87,105]
- *In vivo*: augmentation de l'expression de MANF dans les synoviocytes dans un modèle murin d'arthrite inflammatoire [80]
- Taux d'ARNm de MANF élevé dans les globules blancs périphériques de patients atteints d'une polyarthrite rhumatoïde ou d'un lupus érythémateux systémique [80]

Néphropathies



- In vivo*:
Augmentation de l'expression de MANF induite par stress du RE dans les ζ podocytaires dans un modèle murin de syndrome néphrotique et dans les ζ tubulaires après ischémie aiguë rénale [68]
Effet cytoprotecteur par restauration de l'homéostasie calcique dans un modèle murin de syndrome néphrotique [89]

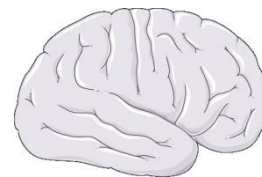
Cardiopathies



- *In vivo*:
Augmentation de l'expression de MANF au sein des cellules cardiaques dans un modèle murin d'ischémie myocardique [77]
Protection contre les lésions cardiaques ischémiques après administration d'un recombinant de MANF [81]
- Taux sérique de MANF moins élevé chez des patients avec une FA [71]

Cancer?

Epilepsie Pathologies neurodégénératives Accidents vasculaires cérébraux



- *In vitro*: rôle neurotrophique [62,83,90,101]
- *In vivo*:
Protection neuronale en cas de lésion cérébrale ischémique, traumatique ou post-épileptique [64,76,85,94]
Stimulation de l'angiogénèse et différenciation des cellules progénitrices neurales après injection de MANF dans une zone infarctée [82,96]
Diminution de la production de protéine β amyloïde dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer [95]
Restauration de la fonction du système nigro-strié dopaminergique après injection intra-striatale de MANF dans un modèle murin de parkinsonisme [90]
- Taux sérique de MANF élevé chez des patients parkinsoniens [72]

Schéma 4. MANF et pathologies humaines médiées par stress du RE

AVC : accident ischémique cérébral, ζ : cellule, FA : fibrillation auriculaire, KO : knock out

6. Objectifs de cette étude

Aucune étude n'a pour l'instant étudié MANF dans le contexte du MM. Seule une analyse immunohistochimique a révélé une expression exclusive de MANF dans le RE des plasmocytes matures non retrouvée dans le RE des lymphocytes B non différenciés ou des lymphocytes T (97).

Dans un premier temps, nous avons donc exploré *in silico* puis *in vitro* la possibilité d'utiliser MANF comme biomarqueur dans le MM. Nous avons ensuite évalué la pertinence en pratique clinique du dosage sérique de MANF au sein d'une cohorte de patients myélomateux.

II) MATERIEL ET METHODES

A. Analyse in silico

Le développement d'outils informatiques performants a permis l'établissement de techniques de simulation numérique centrées sur les systèmes biologiques. Par analogie avec les expressions *in vivo* et *in vitro*, le terme « *in silico* » est employé pour qualifier les recherches réalisées au moyen de ces calculs complexes informatisés et de ces modèles informatiques.

Le National Cancer Institute-60 (NCI-60) est une ressource en accès libre (https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/) mise en place depuis les années 90 pour identifier et caractériser de nouvelles substances ayant potentiellement des propriétés anticancéreuses. Il regroupe 60 lignées cellulaires tumorales humaines issues de 9 types de cancer fréquents chez l'Homme, à savoir des hémopathies malignes lymphoïdes et myéloïdes et des cancers du sein, du poumon, de la prostate, de l'ovaire, du colon, du rein et du cerveau. Cette base de données, pharmacologique et moléculaire, permet l'analyse des profils d'expression génique et la recherche de relations entre gènes dans ces différentes lignées à l'état basal. Il s'agit donc d'un outil intéressant pour tester des hypothèses de recherche avant d'entreprendre des études expérimentales (98).

B. Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires humaines de MM ont été utilisées : la lignée MM.1S (CRL-2974) et la lignée RPMI 8226 (CCL-155), achetées à l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Les lignées cellulaires humaines de carcinome hépatocellulaire (CHC) (PLC/PRF5, Hep3B et Huh7) ont été obtenues auprès du Dr Wychowski (Institut de Biologie de Lille, France). Les lignées cellulaires humaines de glioblastome (H4, A172 et U87) ont été achetées à *Sigma-Aldrich* (Lyon, France) et celles de carcinome épidermoïde tête et cou CSC (SCC9, BICR18, PECA/PJ42, PECA/PJ34) à l'*European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, UK).

Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et cultivées dans un milieu *Dulcecco's Modified Eagle's Medium High glucose* RPMI Medium 1640 (*Sigma-Aldrich*) avec 10% de sérum de veau fœtal (*Jacques Boy*, Reims, France),

décomplémenté pour les lignées de MM, enrichi avec 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. La différence d'adhérence cellulaire entre les lignées de MM (cellules en suspension) et les lignées de tumeurs solides (cellules adhérentes) a été respectée durant la culture cellulaire et la réalisation des expériences.

C. Cohorte de patients

1. Population de sujets sains

La cohorte de sujets sains était constituée de 60 sujets âgés de 20 à 80 ans (5 femmes et 5 hommes par tranche d'âge de 10 ans) considérés comme « sains », à savoir sans antécédent médical personnel connu en dehors d'un tabagisme (sevré ou non), d'une hypertension artérielle (traitée ou non), d'une dyslipidémie (traitée ou non) et/ou d'un éthylisme chronique (sevré ou non). Ces sujets sains ont été recrutés dans la population générale dans le cadre de la participation à un protocole hospitalier de recherche clinique.

2. Population de patients avec une gammopathie monoclonale

Nous avons inclus rétrospectivement les patients âgés de plus de 18 ans suivis dans le service de Médecine Interne du Centre Hospitalo-Universitaire Amiens-Picardie pour une MGUS (à IgG ou IgA) ou un MM selon les critères de l'IMWG et pour lesquels nous disposions d'un échantillon de sérum conservé au sein de la biobanque du CHU Amiens-Picardie. Le recueil de sérum avait été réalisé du 1er septembre 1995 au 31 décembre 2018 sous la responsabilité du Dr Valéry Salle. Nous n'avons pas inclus les patients suivis pour une MGUS à IgM, une maladie de Waldenström, un lymphome lymphoplasmocytaire, une maladie par dépôts de chaînes d'immunoglobulines (amylose primitive AL, maladies avec dépôts de chaînes légères ou lourdes d'Ig), POEMS syndrome, leucémie à plasmocytes ou un plasmocytome solitaire. Les données démographiques, cliniques et cytogénétiques des patients inclus ont été recueillies à partir de la lecture des comptes-rendus médicaux conservés soit dans le dossier archivé (avant le 31 décembre 2004) soit sur le logiciel DX-Care (à partir du 1^{er} janvier 2005). L'analyse cytogénétique était réalisée par technique FISH à l'unité génomique du Myélome initialement à Nantes puis à Toulouse sous la direction du Professeur Hervé Avet-Loiseau. Les données biologiques étaient recueillies à partir des analyses réalisées sur des prélèvements sanguins et urinaires prélevés dans le même temps que l'échantillon de sérum conservé, soit dans le

dossier archivé (avant le 31 décembre 2004) ou soit sur le logiciel DX-Care (à partir du 1^{er} janvier 2005).

3. Cadre éthique

En conformité avec la déclaration d'Helsinki et la législation française, tous les sujets sains et les patients inclus dans cette étude avaient antérieurement donné leur consentement éclairé et signé pour la conservation d'un échantillon de leur sérum au sein de la biobanque du CHU Amiens-Picardie dans le cadre d'éventuelles recherches cliniques ou dans le cadre d'un protocole hospitalier de recherche clinique local ou régional. Le traitement des données était en conformité avec la méthodologie de référence MR-004 de la CNIL.

4. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était la concentration sérique de MANF.

Les critères de jugement secondaires étaient

-facteurs confondants potentiels (facteurs de risque cardio-vasculaires, antécédents neurologiques, auto-immuns, cardiologiques et néoplasiques)

-biomarqueurs usuels du myélome (taux quantifié du pic monoclonal sanguin, ratio des CLL sériques, albuminémie, LDH sérique, protéinurie)

-complications cliniques (lésions osseuses) et biologiques du myélome (anémie, hypercalcémie, insuffisance rénale)

-facteurs pronostiques validés du myélome (scores ISS et R-ISS, anomalies cytogénétiques de haut risque)

-réponse au traitement anti-myéломateux (selon les critères de l'IMWG (99))

-survie globale et survie sans événement.

D. Dosage de la protéine MANF

Le dosage de la protéine MANF était réalisé par une technique "sandwich" ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) (Human MANF ELISA kit, ab215417, *abcam*, Cambridge, CB2 0AX, UK) avec une mesure quantitative colorimétrique selon les procédures décrites par le laboratoire fournisseur. Le seuil de sensibilité du test était de 30 pg/ml. La lecture de la

densité optique était réalisée avec le lecteur *Labsystems iEMS Reader MF* avec le logiciel *Ascent Software version 2.6* avec une absorbance à 450 nm.

Pour l'analyse *in vitro*, le dosage de MANF dans le milieu extracellulaire était réalisé dans le milieu surnageant après centrifugation des extraits cellulaires. Pour le dosage de la concentration intracellulaire, le culot était lysé dans 200µl de tampon de lyse RIPA (Hepes KOH 20mM, NaCl 5mM, NaF 100nM, βglycérophosphate 50nM, Na₃VO₄ 1mM, NaPP 1mM, *protease inhibitor cocktail* (P8340, *Sigma-Aldrich*)). Un comptage du nombre total de cellules présentes était réalisé au bleu Trypan par microscope optique pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en quantité (ng) de protéine MANF pour 100 000 cellules présentes dans l'échantillon.

Pour l'analyse sur sérum de patients, les échantillons congelés de sérum étaient conservés sous forme de paillettes. Les paillettes sélectionnées étaient acheminées dans de la carboglace jusqu'au service de Biochimie Recherche du CHU d'Amiens-Picardie et conservées à -80°C jusqu'au dosage. Après décongélation à température ambiante, chaque échantillon était préalablement dilué au 1/8^e selon les recommandations du laboratoire fournisseur du kit ELISA.

E. Analyses statistiques

Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé comme test de normalité pour étudier la distribution des variables continues. Les variables continues avec une distribution normale sont présentées sous la forme de moyenne ±écart type et ont été analysées par test t de Student. Les variables continues ne suivant pas une loi normale sont présentées sous forme de médiane [intervalle interquartile] et ont été analysées par test de Wilcoxon-Mann-Whitney et test de Kruskal-Wallis. Les données qualitatives sont présentées sous forme de fréquence (% , n/N) et ont été analysées par test du Chi² (ou test exact de Fisher si n<5). La recherche d'une corrélation entre la concentration de MANF et les différentes variables était réalisée soit par une corrélation de Pearson (pour les variables avec distribution normale) ou soit par une corrélation de Spearman (pour les variables avec distribution non normale). Les analyses de survie étaient réalisées par modèle de Cox. Une valeur de $p < 0,05$ en test bilatéral était considérée comme statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

III) RESULTATS

A. Analyse in silico

Nous avons cherché à identifier des gènes dont les niveaux d'expression sont corrélés avec les gènes de l'UPR (à savoir un seuil r^2 par corrélation de Pearson $> 0,30$, $p < 0,05$). Ainsi, nous avons isolé 8 gènes, parmi les 25 000 que comprend le génome humain, dont l'expression est fortement corrélée à l'activation de l'UPR (*HSPA5*, *HSP90B1*, *HYOU1*, *HERPUD1*, *EDEMI*, *SEL1L*, *ATF4* et *ATF6*) puisqu'ils codent pour des protéines jouant un rôle majeur dans la réponse au stress du RE. L'expression de six de ces gènes est également fortement et significativement corrélée à celle de l'ARNm de la protéine MANF (**Figure 1a**). Il s'agit des gènes *HSP90B1* (Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1 ou Grp94), *HSPA5* (Heat Shock Protein Family A Member 5 ou Grp78), *HYOU1* (Hypoxia Up-Regulated 1 ou Grp 170), *EDEMI* (ER Degradation Enhancing Alpha-Mannosidase Like Protein 1) et *HERPUD1* (Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1), qui codent pour des protéines chaperonnes du RE, ainsi que du gène codant pour le facteur ATF6, régulateur transcriptionnel de chaperonnes dont celles citées précédemment. De plus, il existe une hétérogénéité de transcription de l'ARNm de MANF selon les différents types de tumeurs solides et d'hémopathies malignes (**Figure 1b**). La lignée cellulaire myélomateuse RPMI 8226 apparaît comme une des lignées exprimant le plus l'ARNm de MANF (Z-score=+1,8). Le niveau de transcription de l'ARNm de MANF au sein de cette lignée est par ailleurs supérieur à celui de lignées d'autres types d'hémopathie myéloïde ou lymphoïde. Ces résultats confortent notre hypothèse que MANF pourrait être un marqueur circulant d'intérêt de l'UPR produit par les cellules cancéreuses et notamment myélomateuses.

a)

Gène	r ²	Valeur de p
HSPA5	0,59	1*10 ⁻⁶
HERPUD1	0,56	2*10 ⁻⁶
HSP90B1	0,5	5*10 ⁻⁵
HYOU1	0,42	0,0009
EDEM1	0,41	0,0012
ATF6	0,39	0,0022

b)

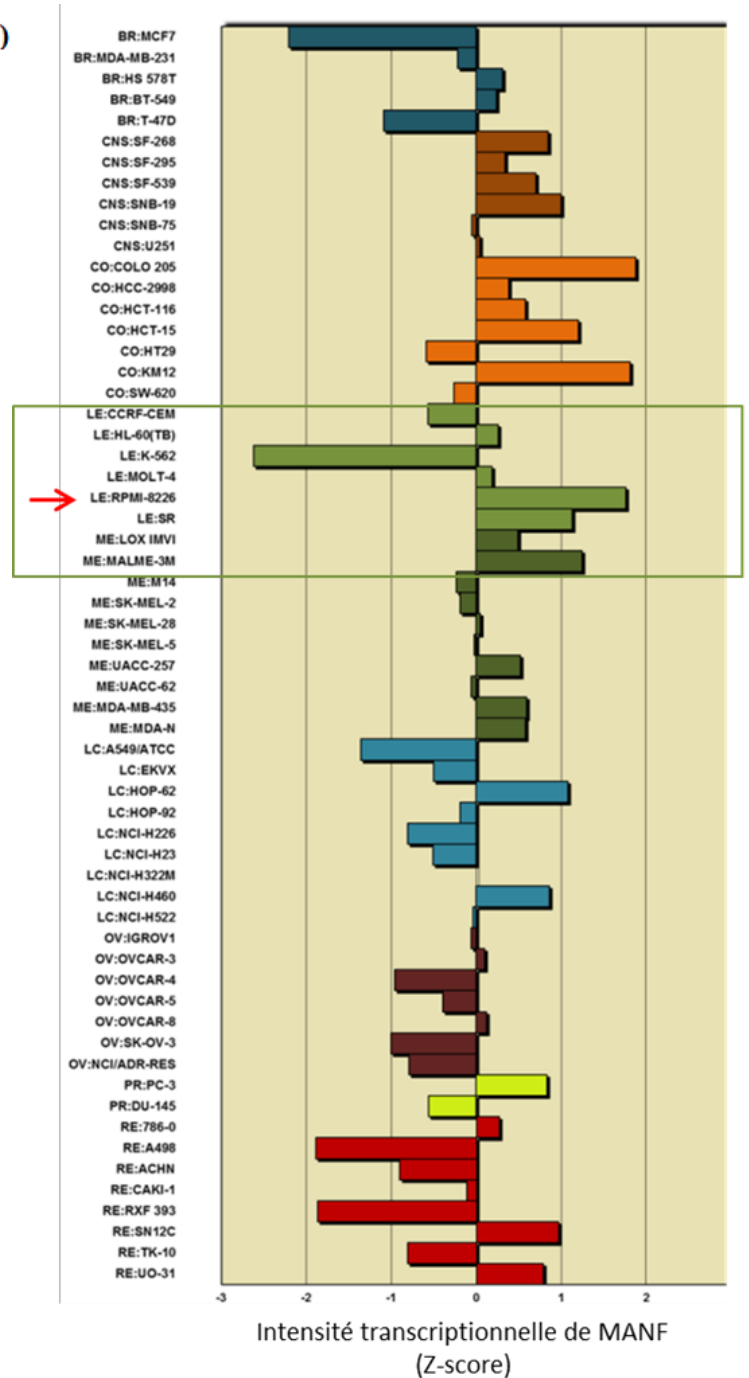


Figure 1. Expression transcriptionnelle de MANF dans différentes lignées cellulaires malignes communes

a) Corrélation des niveaux d'ARNm transcrits de gènes UPR et l'ARNm de MANF. Les données ont été obtenues à partir du *National Cancer Institute-60*. L'analyse statistique a été réalisée par corrélation de Pearson avec un seuil $r^2 > 0,30$ et $p < 0,05$. **b) Niveaux d'expression transcriptionnelle de l'ARNm de MANF selon différentes lignées cellulaires humaines de cancer solide ou d'hémopathie maligne.** Les lignées cellulaires sont classées par type de cancer (BR : breast cancer ; CNS : central nervous system cancer ; CO : colon cancer ; LE : leukemia ; ME : melanoma ; LC : lung cancer ; OV : ovarian cancer ; PR : prostate cancer ; RE : renal cancer). Les barres horizontales représentent le niveau d'expression sur une échelle logarithmique centrée sur 0, moyenne globale des niveaux d'expression dans les 60 lignées (98). La flèche rouge pointe la lignée de myélome multiple RPMI 8226 et l'encadré vert regroupe les lignées d'hémopathies malignes.

B. Analyse in vitro

Nous avons mesuré les concentrations de protéine MANF intracellulaire et dans le milieu extracellulaire à l'état basal pour 12 lignées cellulaires tumorales, à savoir deux lignées de MM (MM1.S et RPMI 8226), trois lignées de CHC (PLC/PRF5, Hep3B et Huh7), trois lignées de glioblastome (H4, A172 et U87) et 4 lignées de carcinome épidermoïde tête et cou (SCC9, BICR18, PECA/PJ42, PECA/PJ34) (**Figure 2**).

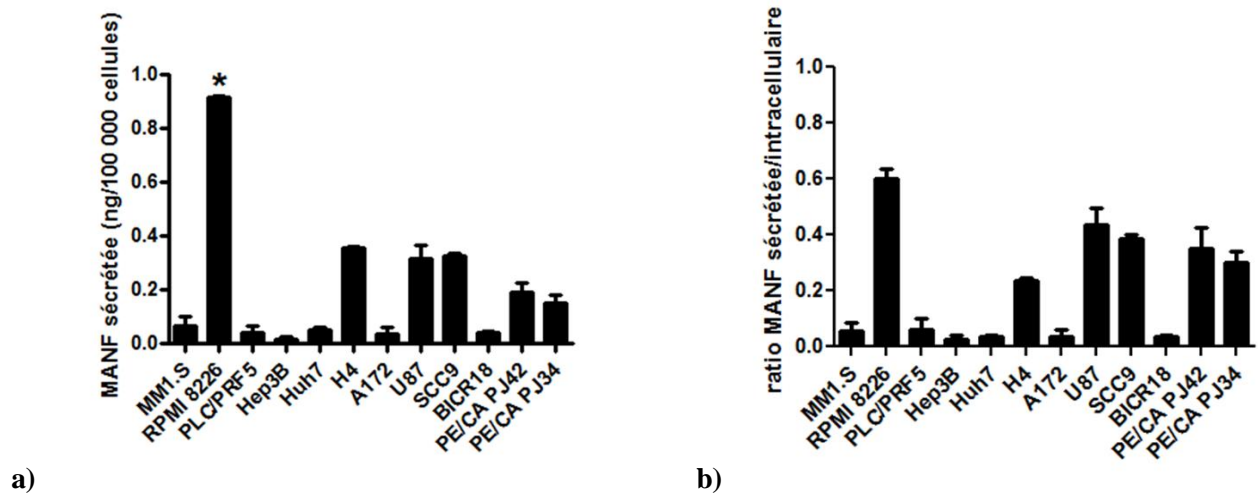


Figure 2 : Hétérogénéité d'expression intracellulaire et de sécrétion de la protéine MANF selon différentes lignées tumorales. a) Sécrétion basale de MANF pour différents types de lignées de myélome multiple (MM) ou de cancer solide. Douze lignées cellulaires tumorales ont été étudiées : deux lignées de MM (MM1.S et RPMI 8226), trois lignées de carcinome hépatocellulaire CHC (PLC/PRF5, Hep3B et Huh7), trois lignées de glioblastome (H4, A172 et U87) et 4 lignées de carcinome épidermoïde tête et cou (SCC9, BICR18, PECA/PJ42, PECA/PJ34). Les puits étaientensemencés (5×10^5 /ml pour les lignées de myélome multiple et 2×10^5 /ml pour les autres lignées) en quatre répliques. Le dosage de la protéine MANF était réalisé par technique ELISA dans chaque surnageant après centrifugation des échantillons 24h après ensemencement. Les résultats sont exprimés en ng pour 100 000 cellules présentes dans l'échantillon. Une étoile * indique une différence significative $p < 0,05$ entre la lignée RPMI 8226 et les autres lignées. **b) Ratio entre concentration intracellulaire et concentration dans le milieu extracellulaire de MANF.** Le culot cellulaire, obtenu après centrifugation des échantillons, était lysé dans un tampon de lyse pour permettre une mesure de la concentration de MANF intracellulaire.

Il existe également une hétérogénéité d'expression protéique de MANF selon ces lignées. La lignée RPMI 8226 est une des lignées ayant la plus forte concentration intracellulaire de protéine MANF (avec les lignées SCC9 et U87) alors que la lignée MM1.S présente au contraire une faible expression intracellulaire de MANF (MM1.S vs RPMI 8226 : $p=0,013$ selon le test t de Student). De plus, la lignée RPMI 8226 apparaît de façon significative comme la lignée étudiée sécrétant le plus fortement MANF (RPMI 8226 vs autres lignées : $p=0,018$) alors que la lignée MM1.S est une des lignées sécrétant MANF en faible quantité. Pour toutes les lignées, la concentration intracellulaire de MANF est plus élevée que la

concentration extracellulaire et il existe une corrélation significative entre la concentration intracellulaire de MANF et la quantité sécrétée dans le milieu (selon la corrélation de Pearson avec $r^2=0,17$, $p=0,0037$). Ainsi, une faible sécrétion de MANF dans le milieu n'est pas liée à une machinerie de sécrétion non fonctionnelle mais à une faible expression intracellulaire de MANF.

C. Caractéristiques cliniques des sujets sains

Afin d'étudier une possible variation physiologique de MANF chez l'Homme, nous avons réalisé dans un premier temps un dosage de MANF dans le sérum de 30 femmes et 30 hommes considérés comme « sains ». Les caractéristiques démographiques de ces sujets sont décrites dans le **Tableau 1**. Aucun sujet n'était diabétique.

	Total (N=60)	Hommes (N=30)	Femmes (N=30)	
Age, années				
Médiane [IIQ]	51 [28,8]	49,2 [26,9]	49,9 [32,6]	$p=0,8$
IMC, kg/m²				
Médiane [IIQ]	25,4 [5,1]	25,1 [4,7]	25,9 [5,3]	$p=0,91$
Facteurs de risque cardiovasculaire				
n (%)				
– hypertension artérielle	12 (20)	8 (26,7)	4 (13,3)	$p=0,33$
– dyslipidémie	2 (3,3)	9 (30)	3 (10)	$p=0,10$
– tabagisme	13 (21,7)	8 (26,7)	5 (16,7)	$p=0,53$
– obésité	3 (5)	0 (0)	3 (10)	$p=0,24$
– éthylisme chronique	2 (3,3)	2 (6,7)	0 (0)	$p=0,49$

Tableau 1. Caractéristiques des sujets sains

IIQ : intervalle interquartile, IMC : indice de masse corporelle

D. Caractéristiques cliniques et biologiques des patients avec une gammopathie monoclonale

Soixante-treize patients ont été inclus dans le groupe MGUS et 68 patients dans le groupe MM. Le nombre de patients perdus de vue était de 17 dans le groupe MGUS et de 10

dans le groupe MM ($p=0,21$) et la durée de suivi médiane était respectivement de 78,1 [66,6] mois et de 51,6 [59] mois ($p=0,0218$).

1. Groupe MGUS

Le dosage sérique de MANF a été réalisé chez 11 patients avec une MGUS à Ig A et chez 62 patients avec une MGUS à Ig G (**Tableau 2**). Le sex ratio F/H était de 1,60. L'âge moyen était de $62,2 \pm 13,4$ ans chez les femmes et de $66,6 \pm 13,8$ ans chez les hommes. Les facteurs de risque cardiovasculaire et les antécédents des patients étaient disponibles pour 72 patients et sont décrits dans le **Tableau 2**. Douze patients avaient été traités pour une néoplasie solide, pour tous non métastatique et considérée en rémission lors du prélèvement sanguin. Au cours du suivi, un seul patient avec une MGUS a évolué vers un MM symptomatique environ 11 mois après le prélèvement sanguin. Les données des analyses biologiques sont détaillées dans le **Tableau 3**.

2. Groupe MM

Le dosage sérique de MANF a été réalisé chez 54 (79,4%) patients avec un MM à Ig entière, 13 (19,1%) patients avec un MM à chaînes légères et 1 (1,5%) patient avec un MM non sécrétant. Le sex ratio F/H était de 1,125 (**Tableau 2**). L'âge moyen était de $67,2 \pm 10,1$ ans chez les femmes et de $65,4 \pm 10,1$ ans chez les hommes. Les facteurs de risque cardiovasculaires et les antécédents étaient disponibles pour 65 patients et sont décrits dans le **Tableau 2**. L'antécédent de cancer solide était significativement moins fréquent dans le groupe MM ($n=3$, tous en rémission; $p=0,03$).

Le prélèvement sanguin était réalisé au diagnostic pour 79,1% (53/67) des patients, au décours d'une rechute pour 8,9% (6/67) des patients et au cours du suivi pour 11,9% (8/67) d'entre eux. La majorité des patients (78%) présentaient un MM dit « symptomatique » (**Tableau 4**). Six patients sur 67 (8,9%) ont présenté une atteinte rénale spécifique du myélome à savoir une tubulopathie myélomateuse ($n=1$), une maladie de Randall ($n=1$), une amylose AL ($n=3$) et une néphropathie glomérulaire ni amyloïde ni Randall ($n=1$).

Au cours du suivi, 68,8 % (11/16) des patients avec un MM indolent ont évolué vers une maladie symptomatique nécessitant l'instauration d'un traitement. La durée médiane entre la date de prélèvement sanguin de ces patients et celle du diagnostic de l'évolution symptomatique de leur maladie était de 15 [10,9] mois.

Les données des analyses biologiques réalisées en routine sont décrites dans le **Tableau 3**. Les données du myélogramme étaient disponibles et exploitables (frottis non hémodilué) pour 40 patients.

Le score pronostique ISS a pu être évalué pour 66 patients (**Tableau 4**). Les données de la cytogénétique étaient disponibles pour 40 patients. Seuls 4 (10%) patients présentaient une anomalie cytogénétique dite « de haut risque », à savoir 3 patients avec une délétion 17p et 1 patient avec une translocation t(4;14).

Parmi les 68 patients du groupe MM, 8 (11,7%) avaient déjà au moins reçu une ligne thérapeutique avant le recueil de sérum (**Tableau 5**). Sur les 52 patients symptomatiques, 51 (98,1%) ont été traités dans les 6 mois après le prélèvement sanguin (**Tableau 5**). La réponse à 6 mois de l'initiation du traitement a pu être évaluée selon les critères de l'IMWG (**Annexe C**) pour les 51 patients traités (**Tableau 5**). Neuf patients (17,6%) ont présenté une maladie d'emblée progressive sous traitement. Pour les 42 autres patients traités, 37 (88%) ont rechuté (selon les définitions de l'IMWG : **Annexe D**) durant le suivi. La survie médiane sans rechute était de 87,6 [122,7] mois et la survie médiane globale de 98,2 [76] mois.

	Myélome Multiple (N=68)	MGUS (N=73)	
Age, années			
Moyenne±écart type	66,3±10,1	66,4±12,1	<i>p=0,98</i>
Sexe féminin			
n/N (%)	36/68 (52,9)	45/73 (61,4)	<i>p=0,38</i>
IMC, kg/m²			
n	38	39	
Médiane [IIQ]	25,2 [6,6]	25,3 [6,2]	<i>p=0,95</i>
Facteurs de risque cardiovasculaires			
n/N (%)			
– hypertension artérielle	32/65 (49,2)	31/72 (43)	<i>p=0,58</i>
– dyslipidémie	14/65 (21,5)	26/72 (36,1)	<i>p=0,09</i>
– tabagisme	10/65 (15,3)	12/72 (16,7)	<i>p=0,84</i>
– obésité	5/65 (7,7)	6/72 (8,3)	<i>p=0,89</i>
– éthylisme chronique	3/65 (4,6)	3/72 (4,2)	<i>p=1,00</i>
Antécédents			
n/N (%)			
– pathologie cardiovasculaire	10/65 (15,4)	18/72 (25)	<i>p=0,16</i>
– pathologie neurologique	6/65 (9,2)	9/72 (12,5)	<i>p=0,54</i>
– pathologie auto-immune	4/65 (6,2)	8/72 (11,1)	<i>p=0,37</i>
– néoplasie (sauf MM)	3/65 (4,6)	12/72 (16,7)	<i>p=0,03</i>
– diabète			
-type 1	0/65 (0)	0/72 (0)	<i>p=1,00</i>
-type 2	8/65 (12,3)	3/72 (4,2)	<i>p=0,12</i>
Circonstances du dosage			
n/N (%)			
– diagnostic	53/67 (79,1)	64/72 (88,9)	<i>p=0,16</i>
– rechute	6/67 (8,9)	-	
– suivi	8/67 (11,9)	8/72 (11,1)	<i>p=1,00</i>
Type de chaîne lourde			
n/N (%)			
– IgA	13/54 (24,1)	11/73 (15,1)	
– IgG	41/54 (75,9)	62/73 (84,9)	<i>p=0,25</i>
Type de chaîne légère			
n/N (%)			
– kappa	43/67 (64,2)	43/73 (59,9)	
– lambda	24/67 (35,8)	30/73 (41,1)	<i>p=0,6</i>

Tableau 2. Caractéristiques des patients avec une gammopathie monoclonale
 IIQ : intervalle interquartile, IMC : indice de masse corporelle.

	n	Myélome Multiple (N=68)	n	MGUS (N=73)
Médiane [IIQ]				
<i>Sérum :</i>				
MANF, ng/ml	68	5,615 [7,595]	73	4,81 [3,237]
Hémoglobine, g/dl	62	11,9 [2,4]	67	13,5 [1,6]
Protides, g/l	62	81 [20]	73	72 [7]
Albuminémie, g/l	62	40 [5,3]	72	40,9 [4,5]
Calcium, mmol/l	61	2,32 [0,13]	72	2,3 [0,12]
CRP, mg/l	60	3,1 [7,6]	61	3,1 [1,5]
Créatinine, μ mol/l	60	85 [28,3]	73	80 [21]
Pic monoclonal [§] , g/l	48	25,3 [15,9]	72	11,6 [5,8]
Chaines légères libres, mg/l	49		56	
-kappa		21,1 [117,9]		14,4 [14,6]
-lambda		13,3 [50,7]		15,4 [16,3]
LDH, UI/l	67	362 [141,5]	66	398,5 [98,8]
β 2microglobuline, μ g/l	68	3340 [2504]	67	2190 [827,5]
<i>Urines :</i>				
Protéinurie, mg/24h	56	199 [1290]	56	89,5 [57,8]
<i>Moelle osseuse :</i>				
Plasmocytes dystrophiques, %	40	15 [21]	62	2 [1]

Tableau 3. Données biologiques des patients avec une gammopathie monoclonale

CRP: protéine C réactive, LDH: lactate déshydrogénase.

[§]pour les MM à Ig entière

	Myélome Multiple (N=68)
Critères « CRAB »	
n/N (%)	
- hyperCalcémie	8/67 (11,9)
- Anémie	24/67 (35,8)
- insuffisance Rénale	8/67 (11,9)
- lésion(s) osseuse(s) (<i>Bone</i>)	43/67 (64,2)
-unique	10/67 (14,9)
-multiples	33/67 (49,3)
Symptomatique	
n/N (%)	52/67 (77,6)
Facteurs pronostiques	
Anomalies cytogénétiques à «haut risque »	
n/N (%)	4/40 (10)
ISS	
n/N (%)	
- 1	34/66 (51,5)
- 2	17/66 (25,8)
- 3	16/66 (24,2)
R-ISS	
n/N (%)	
- 1	19/36 (52,8)
- 2	17/36 (47,2)
- 3	0/36 (0)

Tableau 4. Critères « CRAB » et facteurs pronostiques des patients avec un myélome multiple

ISS: International Staging System, R-ISS: revised International Staging System.

Myélome Multiple	
(N=68)	
Patients traités avant le prélèvement sanguin	
n/N (%)	8/68 (11,7)
Type(s) de traitement	
– autogreffe	2/68 (2,9)
– melphalan	8/68 (11,8)
– cyclophosphamide	2/68 (2,9)
– bortézomib	1/68 (1,5)
– immunomodulateur	2/68 (2,9)
– corticothérapie	7/68 (10,3)
– bisphosphonate	1/68 (1,5)
– radiothérapie	0/68 (0)
– autre (vincristine, doxorubicine)	6/68 (8,8)
Patients traités après le prélèvement sanguin	
n/N (%)	51/66 (77,3)
Type(s) de traitement	
– autogreffe	21/66 (31,8)
– melphalan	42/66 (63,6)
– cyclophosphamide	17/66 (25,8)
– bortézomib	22/66 (33,3)
– immunomodulateur	15/66 (22,7)
– corticothérapie	46/66 (69,7)
– bisphosphonate	8/66 (12,1)
– radiothérapie	15/66 (22,7)
– autre (vincristine, doxorubicine)	1/66 (1,5)
Réponse à 6 mois (patients traités)	
n/N (%)	
– complète stringente	7/51 (13,7)
– complète	6/51 (11,8)
– très bonne réponse partielle	10/51 (19,6)
– partielle	9/51 (17,6)
– stable	6/51 (11,8)
– progression	9/51 (17,6)
Complications liées au traitement (patients traités)	
n/N (%)	
Diabète cortico-induit	1/51 (19,6)
Neuropathie chimio-induite	11/51 (21,6)

Tableau 5. Traitements et réponse thérapeutique des patients avec un myélome multiple

E. Concentration sérique de MANF

1. Sujets sains

Le taux médian de MANF sérique était de 4,84 [3,02] ng/ml chez les femmes et de 8,96 [7,49] ng/ml chez les hommes ($p=0,028$) (**Figure 3a**). Nous avons estimé la concentration médiane sérique de MANF selon trois tranches d'âge égales (**Tableau 6**). La concentration sérique de MANF diminuait de façon significative avec l'âge dans la population globale de sujets sains ($p=0,0077$ selon Kruskal-Wallis ; $r^2=0,072$ selon Spearman, $p=0,021$) (**Figure 3b**) et le sous-groupe de femmes ($p=0,0155$ selon Kruskal-Wallis ; $r^2=0,15$ selon Spearman, $p=0,018$). Une baisse de MANF avec l'âge était également retrouvée chez les sujets de sexe masculin mais de façon non statistiquement significative (**Tableau 6**).

MANF sérique n'était pas corrélé avec l'indice de masse corporelle (IMC) ($r^2= -0,04$ selon Spearman, $p=0,76$). La durée de conservation du sérum n'avait pas d'influence sur le dosage. Enfin, la variabilité des taux n'était pas associée de façon significative avec un éventuel facteur de risque cardiovasculaire.

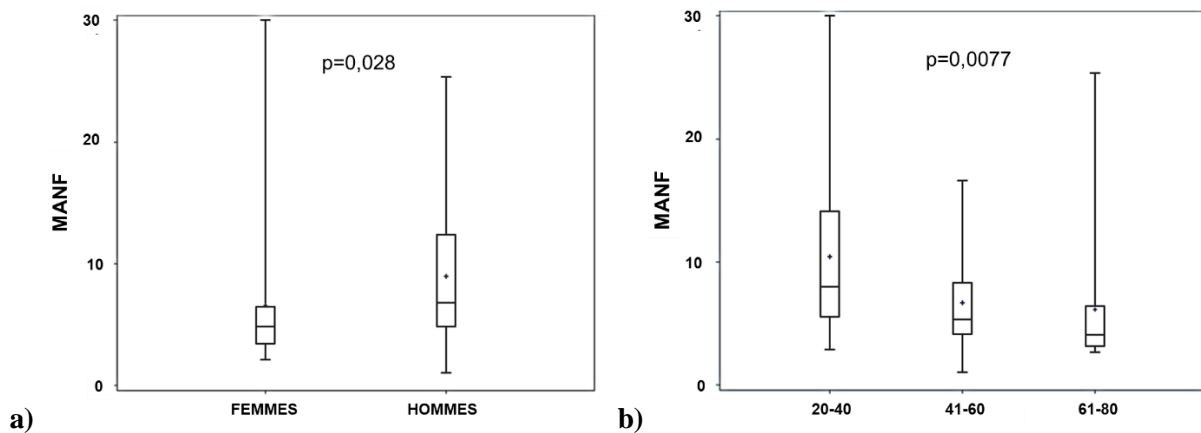


Figure 3. Concentration sérique de MANF (ng/ml) chez les sujets sains
a) selon le sexe
b) par tranches d'âges (années)

Age (années)	Sujets sains				MGUS					MM													
	20-40		41-60		61-80		20-40		41-60		61-80		>80		41-60		61-80		>80				
	n		n	n		p	n	n	n	n	p	n	n	n	n	n	n	p					
Total	20	7,98 [8,56]	20	5,31 [4,20]	20	4,08 [3,26]	0,0077	1	9,45 [0]	20	4,98 [2,29]	42	4,48 [4,19]	10	5,73 [3,72]	0,33	17	9,87 [7,88]	44	4,84 [4,01]	7	7,31 [13,1]	0,040
Femmes	10	7,77 [5,11]	10	4,84 [1,52]	10	3,72 [1,46]	0,0155	1	9,45 [0]	12	5,89 [2,71]	24	4,74 [4,46]	8	5,23 [4,68]	0,36	8	7,03 [8,78]	23	5,61 [5,68]	5	3,58 [7,77]	0,68
Hommes	10	8,67 [12,00]	10	7,80 [7,94]	10	5,91 [6,60]	0,335	-	-	8	4,49 [1,59]	18	4,42 [2,76]	2	6,78 [1,89]	0,32	9	11,54 [6,32]	21	4,04 [3,42]	2	11,67 [8,72]	0,011

Tableau 6. Concentration sérique médiane [IIQ] de MANF (en ng/ml) par tranches d'âge chez les sujets sains et les patients avec gammopathie monoclonale

2. Patients avec une gammopathie monoclonale

Le taux sérique médian de MANF était de 4,81 [3,237] ng/ml chez les patients MGUS (n=73) et de 5,615 [7,595] ng/ml chez les patients MM (n=68) non appariés (p=0,23) (**Figure 4**). Contrairement aux sujets sains, il n'y avait pas de différence statistiquement significative de MANF entre les deux sexes aussi bien dans le groupe MGUS (5,14 [3,28] ng/ml chez les femmes vs 4,50 [2,34] ng/ml chez les hommes, p=0,35) que dans le groupe MM (5,62 [7,64] ng/ml chez les femmes vs 5,62 [2,34] ng/ml chez les hommes, p=0,61). La concentration médiane de MANF n'était pas statistiquement différente selon les tranches d'âge dans le groupe MGUS (**Tableau 6**). Dans le groupe MM, les hommes âgés de 61 à 80 ans présentaient des taux de MANF plus bas que ceux âgés de plus de 80 ans (**Tableau 6**). Il n'y avait pas de corrélation significative selon l'IMC et le taux de MANF n'était pas significativement plus élevé chez les patients diabétiques ou ayant une pathologie neurologique, cardiovasculaire ou auto immune dans les deux groupes.

Nous avons comparé le taux sérique de MANF chez 33 patients MM appariés selon l'âge et le sexe avec 33 témoins sains (issus de la population de sujets « sains » précédemment décrite) sans mettre en évidence de différence significative (respectivement 6,50 [7,70] ng/ml vs 4,87 [3,16] ng/ml, p=0,19) (**Figure 5a**). De même, nous n'avons pas montré de différence entre des patients MGUS appariés avec des sujets sains (n=36; respectivement 4,87 [2,62] ng/ml vs 4,88 [3,69] ng/ml, p=0,84) (**Figure 5b**). A noter, qu'aucune différence significative n'était également retrouvée même sans appariement entre les patients des groupes MM (n=68) et MGUS (n=73) avec les sujets sains (n=60) (p=0,32).

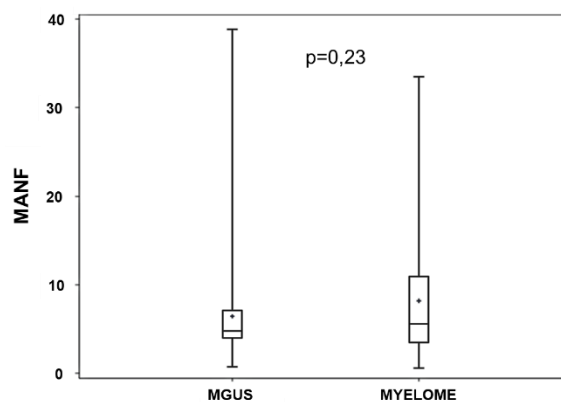


Figure 4. Concentration sérique de MANF (ng/ml) chez les patients MM et les patients MGUS

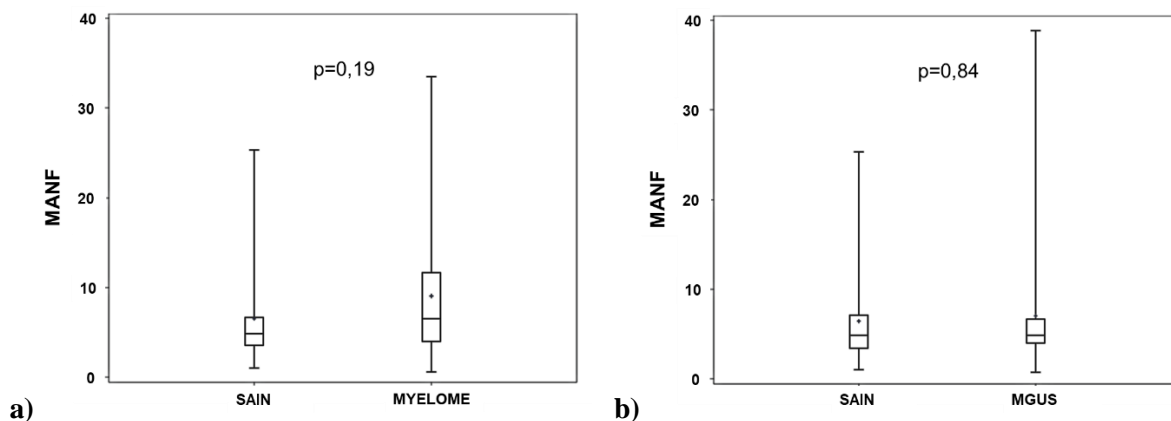


Figure 5. Concentration sérique de MANF (ng/ml) entre sujets sains et patients avec gammopathie monoclonale appariés selon l'âge et le sexe
a) patients MM appariés avec des sujets sains (n=33)
b) patients MGUS appariés avec des sujets sains (n=36)

Le patient du groupe MGUS ayant évolué vers un MM symptomatique avait un taux sérique de MANF à 7,73 ng/ml, sans différence significative par rapport aux autres patients du groupe MGUS. Le taux sérique médian de MANF était de 4,844 [9,478] ng/ml chez les patients avec un MM indolent et de 5,68 [6,85] ng/ml chez les patients avec un MM symptomatique ($p=0,66$). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les patients avec un MM à Ig entière, ceux avec un MM à chaînes légères et celui avec un MM non excréteur, avec un taux respectivement de 5,5 [7,13] ng/ml, de 6,18 [3,91] ng/ml et de 13,62 [0] ng/ml ($p=0,48$). De même, il n'y avait pas non plus de différence significative selon les circonstances du dosage ($p=0,6$) ni selon le traitement antérieur ($p=0,72$).

L'existence d'un ou plusieurs critères « CRAB » ou la survenue d'une complication spécifique du myélome au cours du suivi n'était pas associée de façon significative avec le taux mesuré de MANF. En particulier, les patients sans atteinte osseuse avaient un taux de 4,84 [7,55] ng/ml contre 5,68 [7,44] ($p=0,50$) chez les patients ayant au moins une atteinte osseuse. MANF ne différait pas entre les patients avec un MM indolent initialement n'ayant pas progressé au cours du suivi et au contraire ceux ayant évolué vers un MM symptomatique ($p=0,59$). Il n'y avait pas de corrélation significative entre le taux sérique de MANF et la durée de transformation en MM symptomatique ($r^2=0,073$ selon Spearman avec $p=0,48$).

Nous avons recherché une corrélation entre le taux sérique de MANF et les paramètres biologiques usuellement mesurés chez les patients avec un MM (**Tableau 7**). Seule une

corrélation statistiquement significative avec le taux sérique de LDH a été mis en évidence mais à un seuil très faible ($r^2 < 0,30$ selon Spearman) chez l'ensemble des patients avec une gammopathie monoclonale ($r^2 = 0,072$ avec $p = 0,018$). Cette corrélation probablement stochastique était également retrouvée mais toujours à un seuil très bas chez les patients du groupe MM seul ($r^2 = 0,088$ avec $p = 0,015$). Enfin, le taux sérique de MANF n'était pas corrélé avec le pic quantifié de protéine monoclonale même en prenant en compte les 141 patients avec gammopathie monoclonale.

	n	r^2	
Age	68	-0,22	$p = 0,085$
IMC	38	0,0234	$p = 0,45$
Créatinémie	60	-0,001	$p = 0,51$
Hémoglobinémie	62	-0,0701	$p = 0,17$
LDH sérique	67	0,088	$p = 0,015$
Albuminémie	62	-0,167	$p = 0,92$
CRP	60	-0,061	$p = 0,70$
$\beta 2$ microglobulinémie	68	0,0034	$p = 0,60$
Pic monoclonal	48	0,0012	$p = 0,31$
Infiltration plasmocytaire	40	-0,023	$p = 0,99$
Protéinurie des 24h	56	-0,045	$p = 0,83$

Tableau 7. Corrélations entre MANF sérique et variables clinico-biologiques chez les patients avec un myélome multiple

r^2 : coefficient de corrélation selon Spearman, taux de significativité $p < 0,05$

Enfin, le taux sérique de MANF n'était pas associé de façon significative aux critères pronostiques du MM dont le score ISS (**Figure 6**) ou à la réponse au traitement (**Figure 7**). Il n'y avait pas non plus de variation selon le type de traitement reçu avant ou après le prélèvement sanguin. Il n'y avait non plus d'association significative avec la survie sans événement et la survie globale.

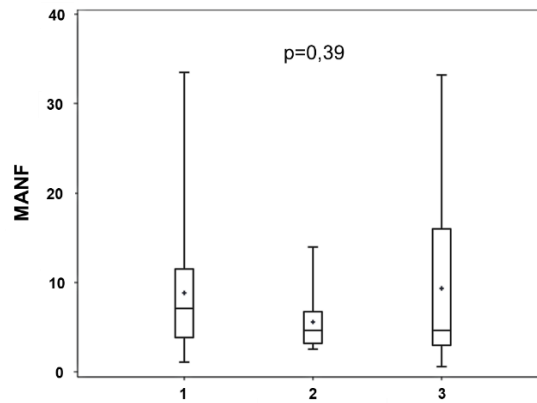


Figure 6. Concentration sérique de MANF (ng/ml) selon le score pronostique ISS chez les patients avec un myélome multiple
 ISS : International Staging System

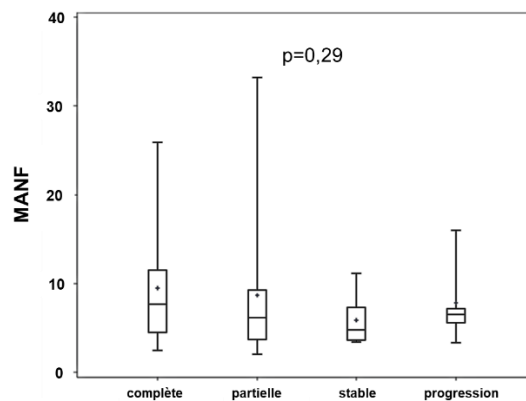


Figure 7. Concentration sérique de MANF (ng/ml) selon la réponse au traitement chez les patients avec un myélome multiple

Pour augmenter la puissance, nous avons réuni sous l'item « réponse complète » les patients avec une réponse complète stringente et ceux avec une réponse complète et sous l'item « partielle » les patients avec une très bonne partielle et ceux avec une réponse partielle.

IV) DISCUSSION

1. Fonctions et variations physiologiques de MANF : un rôle possible dans le vieillissement

La structure de MANF et ses effets biologiques sont très conservés entre les différentes espèces invertébrées (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) (63,79,100,101) et vertébrées (souris, rat, humain) (63,64,66,68,70,81,90), ce qui suggère une fonction physiologique essentielle de ce facteur. Dans un premier temps, MANF présente un rôle important dans la restauration de l'homéostasie protéique cellulaire en cas de stress du RE. Il possède notamment un motif CXXC similaire à celui de la protéine disulfure isomérase (PDI), une chaperonne du RE qui catalyse le repliement correct des protéines par formation de ponts disulfures (102). MANF pourrait diminuer le niveau de stress du RE en permettant directement aux protéines malformées de retrouver une conformation adaptée (88,102,103). De plus, MANF peut stabiliser la chaperonne BiP sous une configuration fixant l'ADP ce qui empêcherait la dissociation de BiP avec ses protéines « clientes » et favoriserait son activité de chaperonne (104). Par ailleurs, MANF contribue aussi à la survie cellulaire par inhibition directe de facteurs pro-apoptotiques comme Bax. L'extrémité C-terminale de MANF contient en effet un domaine homologue au domaine SAP de Ku70 par lequel il peut lier et inhiber Bax (83,88,103). MANF est aussi capable de moduler la réponse immune en inhibant d'une part le signal NF- κ B (80,91,93) et d'autre part en orientant les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (87,105). MANF limiterait les dommages tissulaires en cas de réaction inflammatoire délétère et aiderait à la réparation des tissus lésés (80,91). Enfin, dans une thématique assez moderne, MANF contrôlerait au niveau de l'hypothalamus la réponse à l'insuline et aurait un impact sur l'appétit et, dès lors, sur la prise pondérale (106). Galli et al ont ainsi montré une augmentation du taux plasmatique de MANF chez 40 volontaires humains âgés de 22 à 77 ans ayant accepté de suivre un jeûn thérapeutique (300 à 400kcal/j) pendant une quinzaine de jours (67). Les taux mesurés étaient inversement corrélés à ceux de l'adiponectine, une hormone impliquée entre autres dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides (67).

L'homéostasie du métabolisme énergétique et la réponse inflammatoire sont deux paramètres clés du processus de vieillissement et sont au cœur de problématiques de recherches actuelles (107). De façon intéressante, Sousa-Victor et al ont mis en évidence une baisse des niveaux protéiques tissulaires de MANF avec l'âge chez la mouche et la souris (69). Cette diminution de MANF s'accompagnait d'un déclin des fonctions métaboliques intestinales chez

la mouche et hépatiques chez la souris (69). Chez l'être humain, le taux sérique de la protéine MANF diminuait significativement avec l'âge dans une cohorte de 60 sujets sains de sexe exclusivement masculin (n=24, âge=21–40 ans ; n=26, âge=41–69 ans ; n=10 âge >60 ans) (69). Dans notre analyse chez des sujets sains, nous avons également retrouvé une baisse significative de MANF avec l'âge dans la population globale et dans le sous-groupe de femmes. Une tendance à la baisse mais non significative était également mise en évidence chez les sujets masculins. De plus, le taux de MANF était significativement plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Dans l'étude de Galli et al, le taux plasmatique de MANF ne variait pas de façon significative avec l'âge (67). Le sexe n'avait pas été recherché comme possible facteur confondant alors que 75% des sujets inclus étaient des femmes (67). Aucune corrélation avec l'IMC n'a été mise en évidence dans notre étude comme dans les deux précédentes (67,69). Cependant, aucune diminution selon le sexe n'était retrouvée dans les deux groupes de patients MM et MGUS et cette observation pourrait être liée au hasard. De plus, les habitudes alimentaires semblent influencer les taux circulants de MANF (67). Il convient de garder en mémoire que celles-ci peuvent être parfois très différentes selon le sexe, les tranches d'âge et les zones géographiques et pourraient expliquer, tout au moins en partie, les disparités des niveaux dosés de MANF.

2. MANF comme biomarqueur de pathologies humaines : des premières études encourageantes

À la suite de l'étude de Galli et al réalisée chez des enfants avec un diabète de type I (66), plusieurs équipes ont entrevu en MANF un possible biomarqueur dosable de l'activation de l'UPR pouvant aider à la prise en charge de certaines pathologies humaines médiées par le stress du RE (70–72). Wu et al ont ainsi mesuré la concentration sérique de MANF chez 115 patients intolérants au glucose, 71 patients diabétiques et 71 témoins appariés selon l'âge, le sexe et l'IMC. L'âge moyen des 257 participants (n=147 femmes) était de 62 ± 8 ans (extrêmes 44-78). Les taux de MANF sérique étaient plus élevés chez les patients intolérants au glucose et diabétiques (respectivement $2,89 \pm 1,09$ ng/ml et $3,03 \pm 1,73$ ng/ml) par rapport au groupe contrôle ($2,13 \pm 1,37$ ng/ml, $p < 0,001$) mais aucune différence significative n'était retrouvée entre les deux groupes de patients (70). Du fait de l'appariement, la variation de MANF selon l'âge et le sexe n'a pas été analysée. Les exemples se sont ensuite multipliés dans la littérature ces deux dernières années. La concentration sérique de MANF était ainsi presque deux fois plus importante chez 30 patients (n=18 femmes) suivis pour une maladie de Parkinson d'âge moyen

de 74,4 (extrêmes 48-87) ans par rapport à un groupe de témoins sains appariés selon l'âge et le sexe ($10,2 \pm 8,6$ ng/ml vs $5,0 \pm 4,0$ ng/ml, $p < 0,001$) (72). Aucune variation de MANF selon l'âge n'a été retrouvée tandis qu'une possible variation selon le sexe ne semble pas avoir été étudiée (72). Il est intéressant de notifier que les taux intracellulaires d'ARNm de MANF ont été quantifiés par RT PCR dans les cellules circulantes du sang (i.e. globules blancs, plaquettes et globules rouges) et n'étaient pas plus élevés chez les patients parkinsoniens (72). Enfin, aucune différence n'était retrouvée entre les concentrations de MANF dans le sérum et celles dans le plasma (résultats non publiés) (72). Plus récemment, Wang et al ont comparé le taux de MANF dans le sérum de 39 femmes et 20 hommes ayant une cardiopathie valvulaire nécessitant une prise en charge chirurgicale (71). Parmi eux, 30 patients ($n=17$ femmes) avaient également une FA. L'apoptose des myocytes atriaux a été évaluée dans chaque pièce opératoire par la technique TUNEL. Les niveaux sériques de MANF étaient ici plus bas chez les patients avec une FA par rapport aux patients « contrôle » ($p < 0,01$, résultats chiffrés non publiés). Les caractéristiques d'âge et de sexe n'étaient statistiquement pas différentes entre les deux groupes. Le taux de MANF sérique était par ailleurs inversement corrélé avec le pourcentage de myocytes apoptotiques ($r^2 = -0,865$ selon Spearman, $p < 0,001$) laissant supposer que la baisse de MANF pourrait être à l'origine de la mort cellulaire accrue des cellules myocardiques atriales (71).

3. MANF dans le myélome multiple: nos résultats

L'enthousiasme naissant autour de MANF nous a donc amenés à l'étudier dans le contexte du MM, ce type de tumeur étant connu pour être très sécrétant et pour dépendre d'une UPR fonctionnelle. Les données de notre analyse bio-informatique obtenues à partir du NCI-60 suggéraient que MANF pourrait être exprimé et hypothétiquement sécrété par de nombreux types de cellules cancéreuses. La lignée myélomateuse RPMI 8226 présentait notamment un haut niveau d'expression d'ARNm de MANF, parfois nettement supérieur à ceux retrouvés dans d'autres lignées de tumeurs solides et d'hémopathies malignes. De plus, ces résultats confortent ceux de précédentes études ayant suggéré un lien étroit entre MANF et les voies de l'UPR, plus particulièrement ici avec la voie ATF6. En effet, tous tissus tumoraux confondus, toutes les protéines de l'UPR qui corrélaient avec l'expression transcriptionnelle de MANF sont connues pour être régulées par le facteur ATF6 (43). Il avait déjà été montré que le promoteur de MANF possède une séquence ERSE II reconnue par les deux isoformes d'ATF6 (63,74).

Dans un deuxième temps, l'analyse sur lignées cellulaires a permis de confirmer que la lignée RPMI 8226 exprime et sécrète la protéine MANF dans le milieu environnant de façon également plus importante que d'autres lignées tumorales de cancer solide. Néanmoins, *a contrario*, une autre lignée myélomateuse de référence MM1.S exprime et sécrète peu ce facteur.

Nous avons transposé nos résultats à un panel de patients avec une dyscrasie plasmocytaire monoclonale dans le but de valider une utilisation clinique du dosage de MANF. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de taux sérique de MANF entre le groupe MM et le groupe MGUS. Il semble tout de même intéressant de souligner la grande variabilité des taux dosés au sein de ces deux groupes. Cette hétérogénéité biologique peut être mise en parallèle aux niveaux très différents de sécrétion extracellulaire de MANF mesurés entre les deux lignées myélomateuses *in vitro*. Ce d'autant plus qu'aucune variation selon le sexe n'a été retrouvée dans les deux groupes MM et MGUS et que MANF ne variait pas de façon graduelle selon l'âge contrairement aux sujets sains. De façon similaire, Steiner et al avait mesuré des taux très hétérogènes de la protéine BiP dans le sang périphérique et dans le sang de moelle osseuse de patients atteints d'un MM au diagnostic ou en rechute et de patients suivis pour une MGUS sans mettre en évidence de différence significative entre ces deux groupes (108). Le MM se distingue de pathologies comme le diabète et le parkinsonisme par une hétérogénéité de caractéristiques oncogénétiques et immunophénotypiques qui en font une maladie complexe et composite (109,110). Il avait été montré que les voies de l'UPR ne sont pas activées de façon similaire entre différentes lignées de cellules myélomateuses (39,44) et également entre les patients MM (46). De plus, une possible participation de l'UPR au « stade MGUS » de la maladie myélomateuse a été peu explorée. Certains patients MGUS peuvent présenter un pic monoclonal relativement élevé (par définition, jusque 30g/l) sans pour autant répondre aux critères diagnostiques du MM (6). Les plasmocytes alors impliqués pourraient donc être également soumis à un stress du RE responsable d'une sécrétion de MANF. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de corrélation entre le taux circulant de MANF et le pic quantifié d'Ig monoclonale chez les patients MM ni les patients MGUS.

Aussi, les taux mesurés chez nos patients pourraient-ils être simplement le reflet d'une sécrétion physiologique de MANF à l'état basal par divers types de cellules et de tissus non tumoraux. Notre étude n'avait pas été pensée initialement pour comparer la concentration sérique de MANF entre sujets sains et patients atteints d'une gammopathie monoclonale. En effet, il s'agit d'une étude exploratoire et très peu de données étaient disponibles dans la

littérature sur les valeurs des taux sériques physiologiques de MANF chez l'Homme à l'initiation de ce projet. Par ce choix de réaliser un dosage dans une population considérée « saine » de sujets âgés de 20 ans à 80 ans, nous avons pu également montrer que le taux sérique MANF variait en fonction de l'âge mais possiblement aussi en fonction du sexe, ces deux facteurs n'ayant pas été systématiquement étudiés comme possibles facteurs confondants dans les études antérieurement publiées (67,70,72). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre patients avec une gammopathie monoclonale et sujets sains même non appariés. Les patients MM et MGUS étaient plus âgés que les sujets sains ($p < 0,001$) et on aurait pu imaginer que les niveaux sériques de MANF auraient été plus bas chez ces patients. On peut émettre l'hypothèse qu'une partie du MANF sérique détecté chez les patients MGUS et MM pourrait résulter tout de même d'une sécrétion plasmocytaire pathologique.

4. Le dosage de MANF serait-il pertinent en pratique clinique ?

Les résultats du dosage de MANF circulant précédemment obtenus chez des sujets humains ayant une pathologie en lien avec une activation délétère de l'UPR sont en cohérence avec ceux obtenus *in vitro* (62,86,92) et chez l'animal (84,90,92). Ces données renforcent l'hypothèse d'une participation de MANF dans la physiopathologie de ces maladies et laissent entrevoir la possibilité d'utiliser ces propriétés cytoprotectives à des fins thérapeutiques. La question se pose néanmoins de la pertinence du dosage de MANF en pratique courante pour la prise en charge de ces patients. A partir de modèles murins de syndrome néphrotique et de nécrose tubulaire aiguë d'origine ischémique, Kim et son équipe avaient montré la présence de MANF dans les urines en lien avec une activation de l'UPR (68). Sa détection précédait même l'apparition d'une protéinurie et de lésions histologiques significatives (58). Le dosage urinaire de MANF serait alors utile pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des néphropathies glomérulaires et tubulaires à un stade précoce (58). L'étude de Wu et al avait montré une corrélation significative entre les taux sériques de MANF et des indices de sensibilité à l'insuline uniquement dans le groupe de patients « pré-diabétiques » suggérant que MANF pourrait être un facteur prédictif du risque d'évoluer vers un authentique diabète de type 2 (78). Enfin, le taux sérique de MANF corrélait avec une échelle d'évaluation de la symptomatologie dépressive chez les patients parkinsoniens (72). Aucune corrélation avec d'autres échelles cliniques validées comme l'UPDRS (pour *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) n'était retrouvée. La dépression est considérée comme une des premières

manifestations de la maladie de Parkinson mais n'est pas spécifique de cette pathologie (111). Le dosage de MANF chez des patients souffrant de dépression pourrait être étudié comme possible marqueur prédictif d'évoluer vers une pathologie neurodégénérative.

Les résultats de notre étude n'ont pas permis de valider le dosage de MANF dans le sérum de patients atteints d'un MM comme facteur pronostique de sévérité de la maladie ni comme marqueur prédictif de la réponse au traitement. De plus, le faible nombre de patients inclus dans le groupe MGUS ne nous ont pas permis d'évaluer si le dosage de MANF pourrait être un marqueur du risque de développer à plus ou moins long terme un MM. Nous avons seulement mis en évidence une corrélation très faible et probablement liée au hasard avec le taux sérique de LDH, un des marqueurs biologiques pronostiques du MM (8,112,113). Un rationnel biologique présomptueux pourrait être évoqué. Enzyme clé de la dernière étape de la glycolyse anaérobie, la LDH catalyse la conversion du pyruvate en lactate pour assurer une production d'ATP en cas d'hypoxie (114,115). Malgré un rendement énergétique plus faible que la phosphorylation oxydative, les cellules cancéreuses puisent paradoxalement leur énergie essentiellement à travers cette voie métabolique même en présence d'oxygène. Ce phénomène appelé « effet Warburg » ou « glycolyse aérobie » permettrait en partie aux cellules tumorales de proliférer dans un microenvironnement plus hostile en étant moins dépendantes de l'oxygène (114–116). De façon intéressante, les taux élevés de LDH mesurés dans de nombreux cancers solides et hémopathies malignes ne seraient pas que le reflet de la masse tumorale mais également celui de la réponse au stress du RE auquel sont soumises les cellules malignes. En effet, il a été montré que la surexpression de la LDH dans des tissus mélaniques serait régulée en amont par des acteurs majeurs de l'UPR (117).

5. Limites de notre étude

Nos résultats doivent être interprétés avec prudence car le nombre de sérums analysés est relativement faible. En effet, nous avons réalisé un dosage de MANF à partir de tous les sérums congelés à notre disposition uniquement au sein de la biobanque du CHU Amiens-Picardie. Par conséquent, nous n'avons pas calculé un nombre de sujets nécessaires et notre étude manque probablement de puissance statistique. Notre cohorte de patients MM était par ailleurs très hétérogène avec certains patients prélevés au diagnostic et pour d'autres au cours du suivi ou après rechute. De plus, comme nous ne disposions pas de sérums de sujets sains âgés de plus de 80 ans, les possibilités d'appariement avec les patients des groupes MM et

MGUS étaient limitées. Enfin tous les antécédents des patients n'ont pas été collectés et il est possible que la variabilité de MANF sérique observée soit en lien avec des pathologies non encore identifiées. La méthodologie rétrospective sous-entend un biais lié aux données cliniques et biologiques manquantes. Les critères diagnostiques et pronostiques ont évolué ces dernières décennies mais nous nous sommes référés aux critères de l'IMWG les plus récents pour classer les patients (6,99). Enfin, peu d'éléments sont connus sur les ligands interagissant avec ce facteur dans le milieu extracellulaire (79) et MANF pourrait être plus accessible à un dosage plasmatique sanguin. De même, le MM est défini par une prolifération monoclonale plasmocytaire principalement intramédullaire et la plasmocytose circulante dans le sang est considérée comme limitée par définition en dehors des formes leucémisées (118). Le dosage de MANF dans le plasma médullaire, par ponction-aspiration sternale ou iliaque, pourrait donc être plus opportun, idéalement dans une cohorte de patients MM plus homogène.

6. Perspectives

Le dosage de MANF comme biomarqueur ne peut être envisagé sans une détermination préalable et fiable de valeurs physiologiques référentielles chez l'Homme. Ce projet nécessiterait la réalisation d'une étude multicentrique de grand effectif avec l'intégration et le contrôle de nombreux facteurs confondants possibles aussi bien physiologiques que pathologiques, dont certains sont probablement encore méconnus. La poursuite des travaux de recherche fondamentale et sur des cohortes de patients est également indispensable si on envisage le développement de thérapies ciblant MANF. Certaines zones d'ombre autour des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité de ce facteur restent à éclaircir dont la nature du/des récepteur(s) et voie(s) de signalisation cellulaire(s) permettant ses fonctions biologiques. Il serait également intéressant de comprendre la finalité d'une expression et d'une sécrétion de MANF par certaines lignées tumorales et d'étudier plus précisément son rôle dans la tumorigénèse. Liu et al ont récemment suggéré que MANF pourrait agir comme un facteur suppresseur de tumeur par son action inhibitrice sur le signal NF- κ B (93). Il limiterait l'invasion tumorale dans le CHC en empêchant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses (93). Enfin, pour aller plus loin, l'impact d'une modification diététique prolongée par un jeûn sur les niveaux circulants de MANF et la réponse hypothalamique à l'insuline fait écho à des travaux récents sur le microbiome humain (119). Un déséquilibre de la flore microbienne intestinale, induit en outre par une alimentation trop riche, est responsable d'une

dérégulation de la réponse inflammatoire et participe au développement de nombreuses pathologies auto-immunes et tumorales. Coleman et al ont ainsi montré une possible interaction entre dysbiose intestinale, stress du RE et activation de l'UPR (120)

V) CONCLUSION

Notre étude n'a pas permis de valider MANF comme biomarqueur circulant d'intérêt chez les patients atteints d'un MM. Néanmoins, nos données invitent à la réalisation d'études complémentaires pour préciser les mécanismes de sa régulation et son rôle physiopathologique dans le cancer.

De plus, malgré les progrès thérapeutiques de ces dernières années, l'émergence de résistance aux agents anti-myéломateux, notamment aux IP de premières et nouvelles générations, demeure un véritable défi pour les chercheurs. D'après l'étude récente de Zhuang et al (121), cibler l'UPR reste une piste prometteuse. L'identification de biomarqueurs de la protéostase des cellules myéломateuses pourrait être une aide supplémentaire pour la prise en charge des patients en rechute et/ou réfractaire.

Bibliographie

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primer* **2017**;3:17046.
2. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *The Lancet* **2015**;385:2197-208.
3. Kyle RA, Rajkumar SV. Management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Oncol Williston Park N* **2011**;25:578-86.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**;136:359-386.
5. Myeloma - Cancer Stat Facts Disponible sur:
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>
6. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* **2014**;15:538-548.
7. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **2005**;23:3412-20
8. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **2015**;33:2863-9
9. Nishimura KK, Barlogie B, van Rhee F, Zangari M, Walker BA, Rosenthal A, et al. Long-term outcomes after autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Adv* **2020**;4:422-31.
10. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* **2008**;111:2962-72.
11. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* **2003**;10:361-9.
12. Cook G, Zweegman S, Mateos M-V, Suzan F, Moreau P. A question of class: Treatment options for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol* **2018**;121:74-89.
13. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* **2014**;28:1122-8.
14. Nikesitch N, Ling SCW. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance. *J Clin Pathol* **2016**;69:97-101.

15. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **2008**;319:916-9.
16. Jayaraj GG, Hipp MS, Hartl FU. Functional Modules of the Proteostasis Network. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2019**;12:a033951
17. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* **2015**;17:829-38.
18. Karagöz GE, Acosta-Alvear D, Walter P. The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2019**;11:a033886
19. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* **2018**;69:169-81.
20. Plate L, Wiseman RL. Regulating Secretory Proteostasis through the Unfolded Protein Response: From Function to Therapy. *Trends Cell Biol* **2017**;27:722-37.
21. Calame KL, Lin K-I, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* **2003**;21:205-30.
22. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething M-J, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **1988**;332:462-4.
23. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 21 janv 1999;397(6716):271-4.
24. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **1999**;10:3787-99.
25. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* **1998**;12:1812-24.
26. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee A-H, Qian S-B, Zhao H, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **2004**;21:81-93.
27. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* **2016**;529:326-35.
28. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* **2015**;10:173-94.
29. Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem* **2002**;277:49047-54.

30. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **2001**;412:300-7.
31. Iwakoshi NN, Lee A-H, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* **2003**;4:321-9.
32. Reimold AM, Ponath PD, Li YS, Hardy RR, David CS, Strominger JL, et al. Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* **1996**;183:393-401.
33. Zhang K, Wong HN, Song B, Miller CN, Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* **2005**;115:268-81.
34. Galmiche A, Sauzay C, Chevet E, Pluquet O. Role of the unfolded protein response in tumor cell characteristics and cancer outcome. *Curr Opin Oncol* **2017**;29:41-7.
35. Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* **2015**;5:586-97.
36. Cubillos-Ruiz JR, Bettigole SE, Glimcher LH. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* **2017**;168:692-706.
37. Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* **2016**;2:252-62.
38. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* **2007**;11:349-60.
39. Nakamura M, Gotoh T, Okuno Y, Tatetsu H, Sonoki T, Uneda S, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells. *Leuk Lymphoma* **2006**;47:531-9.
40. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* **2006**;107:4907-16.
41. Lee A-H, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**;100:9946-51.
42. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol* **2016**;104:273-80.
43. Mitchell BS. The proteasome--an emerging therapeutic target in cancer. *N Engl J Med* **2003**;348:2597-8.

44. Xu X, Liu J, Huang B, Chen M, Yuan S, Li X, et al. Reduced response of IRE1 α /Xbp-1 signaling pathway to bortezomib contributes to drug resistance in multiple myeloma cells. *Tumori* **2017**;103:261-7.
45. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell* **2013**;24:289-304.
46. Ling SCW, Lau EKK, Al-Shabeeb A, Nikolic A, Catalano A, Iland H, et al. Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* **2012**;97:64-72.
47. Nikesitch N, Tao C, Lai K, Killingsworth M, Bae S, Wang M, et al. Predicting the response of multiple myeloma to the proteasome inhibitor Bortezomib by evaluation of the unfolded protein response. *Blood Cancer J* **2016**;6:e432.
48. Bagratuni T, Wu P, Gonzalez de Castro D, Davenport EL, Dickens NJ, Walker BA, et al. XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. *Blood* **2010**;116:250-3.
49. Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* **2007**;67:1783-92.
50. Borjan B, Kern J, Steiner N, Gunsilius E, Wolf D, Untergasser G. Spliced XBP1 Levels Determine Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to Proteasome Inhibitor Bortezomib Independent of the Unfolded Protein Response Mediator GRP78. *Front Oncol* **2019**;9:1530.
51. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai Y-T, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* **2012**;119:5772-81.
52. Hetz C, Axten JM, Patterson JB. Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nat Chem Biol* **2019**;15:764-75.
53. Papandreou I, Denko NC, Olson M, Van Melckebeke H, Lust S, Tam A, et al. Identification of an Ire1 α endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood* **2011**;117:1311-4.
54. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. **2010**;5:463-6.
55. Galmiche A, Sauzay C, Houessinon A, Chauffert B, Pluquet O. Probing Tumour Proteostasis and the UPR with Serum Markers. *Trends Cancer* **2016**;2:219-21.
56. Sauzay C, Petit A, Bourgeois A-M, Barbare J-C, Chauffert B, Galmiche A, et al. Alpha-foetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **2016**;463:39-44.
57. Bates SE. Clinical applications of serum tumor markers. *Ann Intern Med* **1991**;115:623-38.

58. Duffy MJ. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract* **2013**;22:4-11.
59. Chu J, Cargnello M, Topisirovic I, Pelletier J. Translation Initiation Factors: Reprogramming Protein Synthesis in Cancer. *Trends Cell Biol* **2016**;26:918-33.
60. Ruggero D. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**;5:a012336.
61. Houessinon A, Gicquel A, Bochereau F, Louandre C, Nyga R, Godin C, et al. Alpha-fetoprotein is a biomarker of unfolded protein response and altered proteostasis in hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Cancer Lett* **2016**;370:242-9.
62. Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci MN* **2003**;20:173-88.
63. Mizobuchi N, Hoseki J, Kubota H, Toyokuni S, Nozaki J, Naitoh M, et al. ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. *Cell Struct Funct.* **2007**;32:41-50.
64. Lindholm P, Peränen J, Andressoo J-O, Kalkkinen N, Kokaia Z, Lindvall O, et al. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Mol Cell Neurosci* **2008**;39:356-71.
65. Apostolou A, Shen Y, Liang Y, Luo J, Fang S. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Res* **2008**;314:2454-67.
66. Galli E, Härkönen T, Sainio MT, Ustav M, Toots U, Urtti A, et al. Increased circulating concentrations of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in children with type 1 diabetes. *Sci Rep* **2016**;6:29058.
67. Galli E, Rossi J, Neumann T, Andressoo J-O, Drinda S, Lindholm P. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor Is Upregulated with Therapeutic Fasting in Humans and Diet Fat Withdrawal in Obese Mice. *Sci Rep* **2019**;9:1-12.
68. Kim Y, Lee H, Manson SR, Lindahl M, Evans B, Miner JH, et al. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor as a Urine Biomarker for Endoplasmic Reticulum Stress-Related Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol JASN* **2016**;27:2974-82.
69. Sousa-Victor P, Neves J, Cedron-Craft W, Ventura PB, Liao C-Y, Riley RR, et al. MANF regulates metabolic and immune homeostasis in ageing and protects against liver damage. *Nat Metab* **2019**;1:276-90.
70. Wu T, Zhang F, Yang Q, Zhang Y, Liu Q, Jiang W, et al. Circulating mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is increased in newly diagnosed prediabetic and diabetic patients, and is associated with insulin resistance. *Endocr J* **2017**;64:403-10.
71. Wang C, Yu S, Bao Q, Qiang W, Wu C, Zhang C, et al. Circulating Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor Negatively Correlates with Atrial Apoptosis in Human Chronic Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2019**;75:141-147.

72. Galli E, Planken A, Kadastik-Eerme L, Saarma M, Taba P, Lindholm P. Increased Serum Levels of Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor in Subjects With Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* **2019**;13:929.
73. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **2003**;23:7448-59.
74. Oh-Hashi K, Hirata Y, Kiuchi K. Transcriptional regulation of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in Neuro2a cells. *Cell Mol Biol Lett* **2013**;18:398-415
75. Wang D, Hou C, Cao Y, Cheng Q, Zhang L, Li H, et al. XBP1 activation enhances MANF expression via binding to endoplasmic reticulum stress response elements within MANF promoter region in hepatitis B. *Int J Biochem Cell Biol* **2018**;99:140-6.
76. Airavaara M, Shen H, Kuo C-C, Peränen J, Saarma M, Hoffer B, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J Comp Neurol* **2009**;515:116-24.
77. Tadimalla A, Belmont PJ, Thuerauf DJ, Glassy MS, Martindale JJ, Gude N, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res* **2008**;103:1249-58.
78. Yu Y-Q, Liu L-C, Wang F-C, Liang Y, Cha D-Q, Zhang J-J, et al. Induction Profile of MANF/ARMEF by Cerebral Ischemia and its Implication for Neuron Protection. *J Cereb Blood Flow Metab* **2010**;30:79-91.
79. Bai M, Vozdek R, Hnízda A, Jiang C, Wang B, Kuchar L, et al. Conserved roles of *C. elegans* and human MANFs in sulfatide binding and cytoprotection. *Nat Commun.* 01 2018;9(1):897.
80. Chen L, Feng L, Wang X, Du J, Chen Y, Yang W, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is involved in inflammation by negatively regulating the NF- κ B pathway. *Sci Rep* **2015**;5:8133.
81. Glembotski CC, Thuerauf DJ, Huang C, Vekich JA, Gottlieb RA, Doroudgar S. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *J Biol Chem* **2012**;287:25893-904.
82. Tseng K-Y, Anttila JE, Khodosevich K, Tuominen RK, Lindahl M, Domanskyi A, et al. MANF Promotes Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells with Potential Neural Regenerative Effects in Stroke. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* **2018**;26:238-55.
83. Hellman M, Arumäe U, Yu L, Lindholm P, Peränen J, Saarma M, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons. *J Biol Chem* **2011**;286:2675-80.

84. Lindahl M, Danilova T, Palm E, Lindholm P, Vöikar V, Hakonen E, et al. MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic β cells. *Cell Rep* **2014**;7:366-75.
85. Yang W, Shen Y, Chen Y, Chen L, Wang L, Wang H, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor prevents neuron loss via inhibiting ischemia-induced apoptosis. *J Neurol Sci* **2014**;344:129-38.
86. Hakonen E, Chandra V, Fogarty CL, Yu NY-L, Ustinov J, Katayama S, et al. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death. *Diabetologia* **2018**;61:2202-2214
87. Neves J, Zhu J, Sousa-Victor P, Konjikusic M, Riley R, Chew S, et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina. *Science* **2016**;353:aaf3646.
88. Kim Y, Park S-J, Chen YM. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF), a new player in endoplasmic reticulum diseases: structure, biology, and therapeutic roles. *Transl Res J Lab Clin Med* **2017**;188:1-9.
89. Park S-J, Kim Y, Yang S-M, Henderson MJ, Yang W, Lindahl M, et al. Discovery of endoplasmic reticulum calcium stabilizers to rescue ER-stressed podocytes in nephrotic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:14154-63.
90. Voutilainen MH, Arumäe U, Airavaara M, Saarma M. Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDFN/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease. *FEBS Lett* **2015**;589:3739-48.
91. Zhu W, Li J, Liu Y, Xie K, Wang L, Fang J. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced neural stem cells by regulating NF- κ B and phosphorylation of p38-MAPKs pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2016**;38:205-13.
92. Danilova T, Belevich I, Li H, Palm E, Jokitalo E, Otonkoski T, et al. MANF Is Required for the Postnatal Expansion and Maintenance of Pancreatic β -Cell Mass in Mice. *Diabetes* **2019**;68:66-80.
93. Liu J, Wu Z, Han D, Wei C, Liang Y, Jiang T, et al. MANF inhibits liver cancer via SUMOylation-related suppression of NF- κ B/Snail signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology* **2019**
94. Li Q-X, Shen Y-X, Ahmad A, Shen Y-J, Zhang Y-Q, Xu P-K, et al. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor Prevents Traumatic Brain Injury in Rats by Inhibiting Inflammatory Activation and Protecting the Blood-Brain Barrier. *World Neurosurg* **2018**;117:e117-29.
95. Xu S, Di Z, He Y, Wang R, Ma Y, Sun R, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) protects against A β toxicity via attenuating A β -induced endoplasmic reticulum stress. *J Neuroinflammation*. **2019**;16:35.

96. Gao B, Deng J, Zhang X, Sun H, Jia G, Li J, et al. Effects of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor on cerebral angiogenesis in a rat model of cerebral ischemia. *Neurosci Lett* **2020**;715:134657.
97. Liu J, Zhou C, Tao X, Feng L, Wang X, Chen L, et al. ER stress-inducible protein MANF selectively expresses in human spleen. *Hum Immunol* **2015**;76:823-30.
98. Morvan VL, Robert J. L'exploration *in silico* des collections de cellules et de tumeurs permet-elle l'innovation ? *Innov Thérapeutiques En Oncol* **2016**;2:36-42.
99. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* **2016**;17:328-46.
100. Lindström R, Lindholm P, Kallijärvi J, Palgi M, Saarma M, Heino TI. Exploring the Conserved Role of MANF in the Unfolded Protein Response in *Drosophila melanogaster*. *PloS One* **2016**;11:e0151550.
101. Palgi M, Lindström R, Peränen J, Piepponen TP, Saarma M, Heino TI. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci* **2009**;106:2429-34
102. Lindholm P, Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* **2010**;70:360-71.
103. Liu H, Tang X, Gong L. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor: New endoplasmic reticulum stress response proteins. *Eur J Pharmacol* **2015**;750:118-22.
104. Yan Y, Rato C, Rohland L, Preissler S, Ron D. MANF antagonizes nucleotide exchange by the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nat Commun* **2019**;10:541.
105. Hou C, Wang D, Li X, He Y, Wei C, Jiang R, et al. MANF regulates splenic macrophage differentiation in mice. *Immunol Lett* **2019**;212:37-45.
106. Yang S, Yang H, Chang R, Yin P, Yang Y, Yang W, et al. MANF regulates hypothalamic control of food intake and body weight. *Nat Commun* **2017**;8:579.
107. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med* **2019**;381:2541-51.
108. Steiner N, Borjan B, Hajek R, Jöhner K, Göbel G, Willenbacher W, et al. Expression and release of glucose-regulated protein-78 (GRP78) in multiple myeloma. *Oncotarget* **2017**;8:56243-54.
109. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**;14:100-13.
110. Ledergor G, Weiner A, Zada M, Wang S-Y, Cohen YC, Gatt ME, et al. Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat Med* **2018**;24:1867-76.

111. Dallé E, Mabandla MV. Early Life Stress, Depression And Parkinson's Disease: A New Approach. *Mol Brain*. **2018**;11:18.
112. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* **1991**;115:931-5.
113. Gkotszamanidou M, Kastritis E, Gavriatopoulou MRMMM, Nikitas N, Gika D, Mparmparousi D, et al. Increased serum lactate dehydrogenase should be included among the variables that define very-high-risk multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2011**;11:409-13.
114. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med* **2018**;7:6124-36.
115. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**;123:309-14.
116. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* **2013**;65:904-10.
117. Zhuang L, Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in melanoma increases with disease progression and is associated with expression of Bcl-XL and Mcl-1, but not Bcl-2 proteins. *Mod Pathol* **2010**;23:45-53.
118. Fernández de Larrea C, Kyle RA, Durie BGM, Ludwig H, Usmani S, Vesole DH, et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* **2013**;27:780-91.
119. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **2016**;535:75-84.
120. Coleman OI, Lobner EM, Bierwirth S, Sorbie A, Waldschmitt N, Rath E, et al. Activated ATF6 Induces Intestinal Dysbiosis and Innate Immune Response to Promote Colorectal Tumorigenesis. *Gastroenterology* **2018**;155:1539-1552.
121. Zhuang J, Shirazi F, Singh RK, Kuitse I, Wang H, Lee HC, et al. Ubiquitin-activating enzyme inhibition induces an unfolded protein response and overcomes drug resistance in myeloma. *Blood* **2019**;133:1572-84.

Annexes

MGUS à IgG ou IgA	<p>-Absence de signe clinique et de signe d'amylose (aucun critère « MDEs »)</p> <p><i>et</i></p> <p>-Présence d'un pic monoclonal sérique IgG ou IgA < 30 g/L</p> <p><i>et</i></p> <p>-Plasmocytose médullaire clonale < 10%</p>
Myélome multiple indolent	<p>-Absence de signe clinique de myélome et de signe d'amylose (aucun critère « MDEs »)</p> <p><i>et</i></p> <p>-Pic Ig G ou Ig A \geq 30 g/L ou protéine monoclonale urinaire \geq 500 mg / 24 heures et/ou plasmocytose médullaire comprise entre 10 et 60%</p>
Myélome multiple symptomatique	<p>Plasmocytose médullaire clonale \geq 10% (ou plasmocytome osseux ou extramédullaire prouvé à la biopsie) <i>et</i> au moins un des critères suivants reliés au MM (« Myeloma-Defining Events » ou MDEs) :</p> <p>-présence d'une ou plusieurs atteinte(s) d'organe (critères CRAB) attribuable(s) à la prolifération plasmocytaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> • hyper<u>C</u>alcémie: > 2,75 mmol/L (110 mg/L) ou > 0,25 mmol/L au-dessus des valeurs normales • insuffisance <u>R</u>énale: créatininémie > 173 mmol/L (> 20 mg/L) ou clairance de la créatinine < 40 mL/min • <u>A</u>némie: hémoglobine < 10 g/dL ou au moins 2g/dL en dessous de la limite inférieure de la normale • lésions osseuses (« <u>B</u>one disease »): une ou plusieurs lésions ostéolytiques à l'imagerie (radiographie, CT, PET scan) <p>-présence d'une ou plusieurs biomarqueurs de malignité :</p> <ul style="list-style-type: none"> • plasmocytose médullaire clonale \geq 60% • rapport chaînes légères libres (FLC) impliquées/non impliquées \geq 100 (mais il faut que le taux de FLC soit \geq 100 mg/L) • >1 lésion focale à l'IRM (de diamètre > 5 mm)

Annexe A. Critères diagnostiques du myélome multiple et de la MGUS selon l'IMWG (7)
MDEs : Myeloma-Defining Events, MGUS : Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

Facteurs pronostiques	Critères	Survie médiane (mois)
Score ISS		
I	$\beta 2m < 3,5$ mg/l et Albumine > 35 g/l	62
II	$\beta 2m$ entre 3,5 et 5,5 mg/l ou Albumine < 35 g/l	44
III	$\beta 2m > 5$ mg/l	29
AC par FiSH		
Haut risque	del(17p) et/ou t(4 ;14) et/ou t(14 ;16)	24,5
Risque standard	absence d'AC à haut risque	50,5
LDH		
Normale	LDH sérique $<$ limite supérieure normale	
Elevée	LDH sérique $>$ limite supérieure normale	
R-ISS		
I	ISS I et AC de risque standard et LDH normale	
II	ni R-ISS I ni R-ISS III	
III	ISS III et soit AC de haut risque soit LDH élevée	

Annexe B. Facteurs de risque standard du myélome multiple et Revised-ISS (7)

$\beta 2m$: bêta-2microglobuline, ISS : International Staging System, AC : anomalies chromosomiques, LDH: lactate déshydrogénase

Réponse complète (RC)	-immunofixation sérique et urinaire négatives <i>et</i> -disparition des plasmocytomes des tissus mous <i>et</i> -plasmocytose médullaire < 5% <i>(en cas de maladie uniquement mesurable par le taux des CLL : ratio CLL kappa/CLL lambda normal (0,26-1,65) en complément des autres critères)</i>
Réponse complète stringente (RCs)	-réponse complète telle que définie ci-dessus <i>et</i> -ratio CLL kappa/CLL lambda normal <i>et</i> -absence de cellules clonales dans la moelle osseuse en immunohistochimie ou immunofluorescence (par cytométrie en flux)
Très bonne réponse partielle (TBRP)	-composant monoclonal détectable dans le sang ou dans les urines en immunofixation mais pas à l'électrophorèse <i>ou</i> -réduction ≥ 90 % du composant monoclonal sérique et composant monoclonal urinaire < 100 mg/24h <i>(en cas de maladie uniquement mesurable par le taux sérique des CLL : réduction de plus de 90 % de la différence entre la CLL impliquée et la CLL non impliquée (dCLL))</i>
Réponse partielle (RP)	réduction ≥ 50 % du composant monoclonal sérique et réduction du composant monoclonal urinaire ≥ 90 % ou < 200 mg/24h <i>(si le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines : réduction d'au moins 50 % de la dCLL si le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines et si les CLL ne sont pas non plus mesurables : diminution d'au moins 50 % de la plasmocytose médullaire (à condition d'un pourcentage initial de plasmocytes ≥ 30 %))</i>
Maladie stable (MS)	absence des critères de RC, TBRP, RP et de maladie progressive
Maladie progressive (MP)	augmentation de 25 % par rapport à la valeur la plus basse d'un ou de plusieurs des marqueurs suivants : -composant monoclonal sérique (en valeur absolue, l'augmentation doit être d'au moins 5 g/L) -composant monoclonal urinaire (en valeur absolue, l'augmentation doit être d'au moins 200 mg/24h) -chez les patients dont le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines (et uniquement chez ces patients) : augmentation de la dCLL d'au moins 100 mg/L -plasmocytose médullaire (en valeur absolue, le pourcentage doit être d'au moins 10 %) et/ou apparition de lésions osseuses ou de plasmocytomes des tissus mous ou augmentation de taille des lésions osseuses ou des plasmocytomes existants et/ou apparition d'une hypercalcémie (calcémie sérique corrigée > 2,65 mmol/L) liée au myélome

Annexe C. Critères IMWG de réponse au traitement du myélome multiple (99)

Rechute clinique

Au moins un des critères suivants :

- apparition de nouveau(x) plasmocytomes des tissus mous ou de lésion(s) osseuse(s)
- augmentation de taille $\geq 50\%$ (et $\geq 1\text{cm}$) de plasmocytome(s) des tissus mous ou de lésion(s) osseuse(s) pré-existantes
- hypercalcémie ($>11\text{mg/dL}$)
- diminution de l'Hb $\geq 2\text{g/dL}$ (non attribuable au traitement ni à d'autres étiologies indépendantes du myélome)
- élévation de la créatinémie $\geq 2\text{mg/dL}$ par rapport au début du traitement et attribuable au myélome
- hyperviscosité secondaire à la paraprotéine sérique

Rechute après

- apparition d'au moins un signe de rechute décrit ci-dessus

réponse complète

et/ou

-réapparition du pic monoclonal sérique ou urinaire sur l'électrophorèse ou l'immunofixation

et/ou

-apparition d'une plasmocytose $\geq 5\%$ dans la moelle osseuse

Annexe D. Critères IMWG de réponse au traitement du myélome multiple (99)

ANALYSE DU MESENCEPHALIC ASTROCYTE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (MANF) DANS LE CONTEXTE DU MYELOME MULTIPLE

Résumé

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération clonale de plasmocytes sécrétant une paraprotéine. A l'instar d'autres maladies médiées par le stress du réticulum endoplasmique (RE), l'*unfolded protein response* (UPR) a un rôle clé dans la pathogénèse du MM. Nous avons exploré la possibilité d'utiliser *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF), protéine ubiquitaire sécrétée lors d'un stress du RE, comme biomarqueur dans le MM. Selon le National Cancer Institute-60, la lignée myélomateuse RPMI 8226 est une des lignées tumorales exprimant le plus l'ARNm de MANF. *In vitro*, elle exprime et sécrète la protéine MANF de façon significativement plus importante que d'autres lignées de MM (MM1.S) et de tumeurs solides. Le taux sérique médian de MANF était de 4,81 [3,237] ng/ml chez 73 patients avec une gammopathie monoclonale de signification indéterminée et de 5,615 [7,595] ng/ml chez 68 patients avec un MM non appariés ($p=0,23$). Aucune différence significative n'était retrouvée par rapport à une population de sujets sains (30 femmes et 30 hommes) âgés de 20 à 80 ans. Chez les sujets sains, la concentration médiane sérique de MANF diminuait de façon significative avec l'âge ($p=0,0077$) et était plus élevée chez les hommes (4,84 [3,02] ng/ml versus 8,96 [7,49] ng/ml, $p=0,028$). Notre étude n'a pas permis de valider MANF comme biomarqueur d'intérêt chez les patients atteints d'un MM mais invite à explorer son implication possible dans la tumorigénèse. Des études complémentaires sont également nécessaires pour préciser les facteurs physiologiques influençant le taux circulant de MANF chez l'Homme.

Mots clés : *myélome multiple, mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, unfolded protein response, cancer, biomarqueur*

=====

ANALYSIS OF MESENCEPHALIC ASTROCYTE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (MANF) IN MULTIPLE MYELOMA

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a malignant hemopathy characterized by the clonal proliferation of plasma cells secreting a paraprotein. Like other stress-mediated endoplasmic reticulum (ER) diseases, the unfolded protein response (UPR) has a key role in the pathogenesis of MM. The present study explored the possibility of using mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF), a ubiquitous protein secreted during ER stress, as a biomarker in MM. According to the National Cancer Institute-60, the myeloma line RPMI 8226 is one of the tumor lines that most expresses the mRNA of MANF. *In vitro*, it expresses and secretes the MANF protein significantly more than other lines of MM (MM1.S) and solid tumors. The median serum MANF level was 4.81 [3.237] ng / ml in 73 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 5.615 [7.595] ng / ml in 68 patients with unpaired MM ($p = 0.23$). No significant difference was found compared to a population of healthy subjects (30 women and 30 men) aged 20 to 80 years. In healthy subjects, the median serum MANF concentration decreased significantly with age ($p = 0.0077$) and was higher in men (4.84 [3.02] ng / ml versus 8.96 [7.49] ng / ml, $p = 0.028$). Our study did not validate MANF as a biomarker of interest in patients with MM but calls for analyzing its potential implication in tumorigenesis. Further studies may also clarify the physiological factors that influence the circulating level of MANF in humans.

Key words: *multiple myeloma, mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, unfolded protein response, cancer, biomarker*